

# Citotoksično djelovanje različitih varijeteta *Raphanus sativus* na stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

---

**Bilić, Anamarija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:960897>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**I**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Anamarija Bilić**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE RAZLIČITIH VARIJETETA *RAPHANUS*  
*SATIVUS* NA STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT  
METODOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**I**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Anamarija Bilić**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE RAZLIČITIH VARIJETETA *RAPHANUS*  
*SATIVUS* NA STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT  
METODOM**

**Diplomski rad**

**Akademska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2021.**

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Medicinska kemija i biokemija  
**Tema rada** je odobrena na 70. sjednici Vijeća studija Farmacije, 8. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

**Citotoksično djelovanje različitih varijeteta *Raphanus sativus* na stanične linije humanih karcinoma  
mjereno MTT metodom**

Anamarija Bilić, broj indeksa 191

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak uzoraka dobivenih iz *Raphanus sativus* (L.) i *Brassica rapa* (L.) na stanične linije humanih karcinoma dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24). Korišteni su mikrovalni ekstrakti iz ovih biljnih vrsta. Stanične linije karcinoma dojke i mokraćnog mjehura tretirane su različitim koncentracijama te se citotoksičnost određivala nakon 4, 24, 48 i 72 h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih uzorcima dobivenih iz *Raphanus sativus* i *Brassica rapa* te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka. Najznačajniji citotoksični učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 postignut je djelovanjem uzorka crne rotkvice pri koncentraciji od 100 µg/mL gdje se nakon inkubacije od 72 h broj metabolički aktivnih stanica smanjio na oko 48%. Najznačajniji citotoksični učinak na staničnu liniju T24 pokazuje uzorak bijele repe nakon inkubacije od 72 h pri koncentraciji 50 µg/mL gdje se broj metabolički aktivnih stanica smanjio na oko 16%. Djelovanje uzoraka nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima, dolazi do oporavka stanica.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom „Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala“ (IP-2016-06-1316).

**Ključne riječi:** biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda

**Rad sadrži:** 76 stranica, 20 slika, 4 tablice, 47 referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, predsjednik
2. doc. dr.sc. Marina Degorić, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

**Datum obrane:** 14.10.2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2 .

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Medical Chemistry and Biochemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no.70 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.8 and Faculty Council of School of Medicine, session no.5  
**Mentor:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD  
**Technical assistance:** Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

**The cytotoxic effect of different varieties of *Raphanus sativus* on different human cancer cell lines  
measured by MTT method**

Anamarija Bilić, index number 191

The aim of this research was to examine the cytotoxic effect of samples obtained from *Raphanus sativus* (L.) and *Brassica rapa* (L.) on human breast cancer (MDA-MB-231) and bladder cancer (T24) cell lines. Microwave extracts from these plants were used. Breast and bladder cancer cell lines were treated with different concentrations and cytotoxicity was determined after 4, 24, 48 and 72 h using the MTT method. The ratio of the absorbance of cells treated with samples obtained from *Raphanus sativus* and *Brassica rapa* and the absorbance of those that are not treated is an indicator of the cytotoxic activity of the samples we used. The most significant cytotoxic effect on the MDA-MB-231 cell line was achieved after treatment with black radish sample at a concentration of 100 µg/mL where after incubation of 72 h the number of metabolically active cells decreased to about 48%. The most significant cytotoxic effect on the T24 cell line was achieved after treatment with white turnip sample after incubation for 72 h at a concentration of 50 µg/mL where the number of metabolically active cells decreased to about 16%. The effectiveness of samples is not always proportional to the increase of concentration and incubation time, and in some cases, cell recovery occurs.

This research has been fully supported by the Croatian Science Foundation under the project “Plants as a source of bioactive sulphur compounds and their ability to hyperaccumulate metals” (IP-2016-06-1316).

**Keywords:** plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 76 pages, 20 figures, 4 tables, 47 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Assist. prof. Ana Šešelja Perišin, PhD, chair person
2. Assist. Prof. Marina Degoricija, PhD, member
3. Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member - supervisor

**Defence date:** 14.10.2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## *Zahvale*

*Prije svega, htjela bih se zahvalit svojoj majci na ljubavi i podršci koje mi je pružila tijekom studiranja. Ti si moj najveći uzor i oslonac kroz život! Hvala ti što si pomogla učiniti moje snove stvarnim!*

*Također hvala ostatku moje obitelji i bližnjima koji su bili tu za mene kroz ovih pet godina studija i učinili ih nezaboravnim.*

*Naposlijetku, veliko hvala mojoj mentorici, profesorici Vedrani Čikeš Čulić, na ukazanoj prilici za istraživanje na kojem se temelji ovaj diplomski rad te na pomoći, strpljenju i dijeljenju svog znanja i iskustva.*

*Posveta*

*Mom voljenom djedu Ljubi*

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 RAK .....	2
1.1.1 ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI .....	3
1.1.2 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ.....	5
1.2 RAK DOJKE.....	6
1.2.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....	6
1.2.2 PATOHISTOLOGIJA .....	6
1.2.3 KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA.....	7
1.2.4 LIJEČENJE .....	8
1.3 RAK MOKRAĆNOG MJEHURA .....	11
1.3.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....	11
1.3.2 PATOHISTOLOGIJA .....	11
1.3.3 KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA.....	12
1.3.4 LIJEČENJE .....	13
1.4 PORODICA <i>BRASSICACEAE</i> .....	14
1.4.1 <i>RAPHANUS SATIVUS (L.)</i> .....	14
1.4.2 <i>BRASSICA RAPA (L.)</i> .....	17
1.5 SEKUNDARNI METABOLITI PORODICE <i>BRASSICACEAE</i> .....	19
1.5.1 GLUKOZINOLATI.....	19
1.5.2 IZOTIOCIJANATI.....	19
1.5.3 SULFORAFAN .....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	21
2.1 HIPOTEZA .....	23
3. MATERIJALI I METODE .....	24
3.1 METODA IZOLACIJE.....	25
3.2 STANIČNE LINIJE .....	27
3.3 BILJNI MATERIJALI .....	31
3.3.1 <i>RAPHANUS SATIVUS (L.)</i> .....	31
3.3.2 <i>BRASSICA RAPA (L.)</i> .....	31
3.4 POSTUPAK .....	32
3.4.1 STANIČNA KULTURA.....	32
3.4.2 ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA U KULTURI .....	34



3.4.3 TRETIRANJE STANICA KARCINOMA UZORCIMA CRVENE I CRNE ROTKVICE I BIJELE REPE .....	35
3.5 TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI .....	36
3.6 STATISTIČKA ANALIZA .....	38
4. REZULTATI.....	39
4.1 KARCINOM DOJKE – STANIČNA LINIJA MDA-MB-231 .....	40
4.1.1 CRNA ROTKVICA, <i>RAPHANUS SATIVUS</i> , MIKROVALNA EKSTRAKCIJA. 40	
4.1.2 CRVENA ROTKVICA, <i>RAPHANUS SATIVUS</i> , MIKROVALNA EKSTRAKCIJA .....	41
4.1.3 BIJELA REPA, <i>BRASSICA RAPA</i> , MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....	42
4.2 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA T24.....	43
4.2.1 CRNA ROTKVICA, <i>RAPHANUS SATIVUS</i> , MIKROVALNA EKSTRAKCIJA. 43	
4.2.2 BIJELA REPA, <i>BRASSICA RAPA</i> , MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....	44
5. RASPRAVA .....	45
6. ZAKLJUČAK .....	50
7. LITERATURA .....	52
8. SAŽETAK .....	59
9. SUMMARY .....	62
10. ŽIVOTOPIS.....	65

## **POPIS KRATICA**

### **B**

BCG- *Bacillus Calmette-Guérin*

BHP- benigna hiperplazija prostate

BRCA- tumor supresorski gen

### **C**

CNS- središnji živčani sustav

CT- kompjuterizirana tomografija

### **D**

DCIS- duktalni karcinom dojke *in situ*

DMEM- Dulbecco modificirani Eagleov medij

DMSO- dimetil-sulfoksid

DNA- deoksiribonukleinska kiselina

### **E**

EGFR- receptor epidermalnog čimbenika rasta

ER- estrogenski receptor

ER+- rak dojke s estrogenskim receptorima

### **F**

FBS- fetalni goveđi serum

### **G**

GLS- glukozinolati

### **H**

HER2- receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2

## **I**

IVU- intravenska urografija

ITC- izotocijanati

ITM- indeks tjelesne mase

## **L**

LCIS- lobularni karcinom dojke *in situ*

## **M**

MDA-MB-231- stanična linija karcinoma dojke

MIBC- mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura

MTT- 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

## **N**

NADH- reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida

## **P**

P53- gen za protein p53

PBS- fosfatni pufer

## **R**

RB- tumor supresor

RAS- onkogen

## **S**

SERM- selektivni modulator estrogenskih receptora

SFN- sulforafan

## **T**

T24- stanična linija karcinoma mokraćnog mjehura

TURBT- transuretralna resekcija tumora u mjehuru

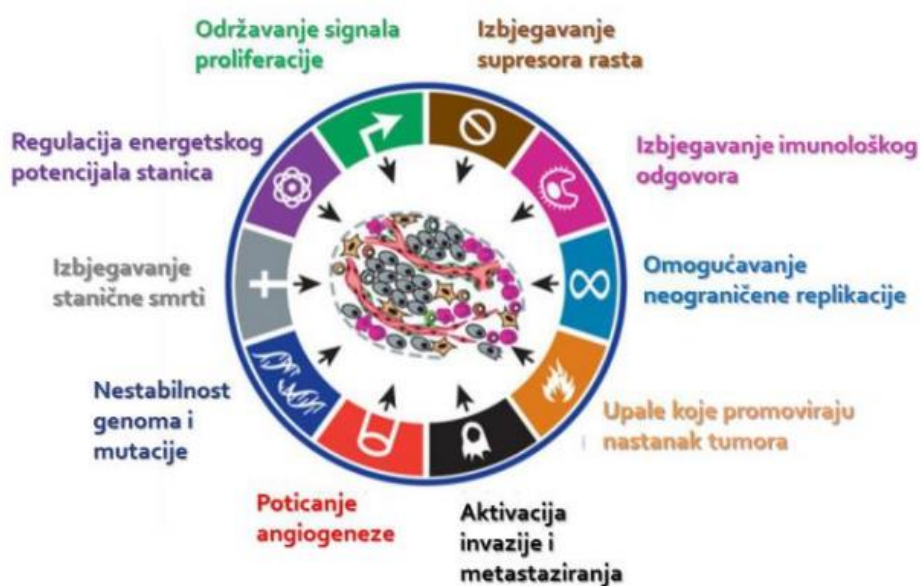
## **1. UVOD**

## 1.1 RAK

Tumor je izraz za patološku tvorbu koja nastaje kao posljedica nenormalne proliferacije stanica (1). Važno je razlikovati dobroćudne (benigne) od zloćudnih (malignih) tumora. Dobroćudni tumor prostorno je ograničen, ne širi se na ostala normalna tkiva. S druge strane, zloćudni tumor širi se na čitavo tijelo preko krvožilnog ili limfnog sustava (tzv. metastaze) (2).

Pojam rak odnosi se na nakupinu zloćudno preobraženih stanica koja se zbog nekontrolirane stanične diobe neprestano povećava (3). Temeljno svojstvo raka je monoklonalnost što znači da nastaje zloćudnom transformacijom jedne jedine zdrave stanice (2,3). U podlozi je tog procesa mutacija gena čija je uloga nadziranje staničnog ciklusa što za posljedicu ima gubitak kontrole staničnog umnožavanja (3). No nastanak i razvoj raka složeni su procesi koji se sastoje od više koraka uključujući mutaciju i selekciju stanica sa sve izraženijom mogućnosti proliferacije, preživljavanja i metastaziranja (2). Zloćudne promjene u ljudi posljedica su međudjelovanja nasljednih faktora i brojnih endogenih (hormoni, imunološki uvjeti) i egzogenih čimbenika (zračenje, duhan, alkohol, kemikalije, virusi) (4).

Deset ključnih značajki svih vrsta raka su: genomska nestabilnost, neosjetljivost na inhibitorne signale, neograničen potencijal umnažanja, zaobilaženje apoptoze (programirane stanične smrti), izbjegavanje imunološkog odgovora, angiogeneza, mogućnost tkivne invazije i presađivanja, samodostatnost u pogledu signala rasta, poremećen metabolizam te upala (Slika 1) (3).



**Slika 1.** Ključne značajke raka

Preuzeto sa:

<https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A1924/datastream/PDF/view>

Datum pristupa: 10.9.2021.

### 1.1.1 ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI

Geni za koje se pokazalo da imaju centralnu ulogu u nastanku raka nazvani su onkogeni (3). Potekli su od normalnih staničnih gena, protoonkogeni, koji sudjeluju u prijenosu signala u stanici regulirajući tako staničnu proliferaciju i diferencijaciju (2,3). Evolucijski su dobro očuvani što ukazuje na njihovu važnost u staničnim procesima (3). Stanični signal često se u stanici prenosi fosforilacijom proteina te se za mnoge protoonkogene ispostavilo da su geni za tirozin-kinaze (proteine koji fosforiliraju tirozinske ogranke drugih staničnih proteina). Ukoliko dođe do promjene protoonkogeni ili njihovih proteinskih produkata tako da oni postaju aktivniji tada nastaju onkogeni, a sam proces naziva se aktivacija onkogeni (3). Do aktivacije protoonkogeni koji kodiraju receptorske tirozin-kinaze dolazi zbog amplifikacije gena ili točkastih mutacija dok delecije i mutacije regulacijskih slijedova aktiviraju nerekceptorske tirozin-kinaze (2). No onkogeni se mogu aktivirati i na druge načine, primjerice translokacijom dijela kromosoma (što je slučaj kod Philadelphia kromosoma u kroničnoj mijelocitnoj leukemiji). Sve te promjene u staničnim

genima kojima protoonkogeni prelaze u onkogene najčešće imaju dominantan učinak što bi značilo da je dovoljna promjena u samo jednom alelu da bi se ostvario učinak onkogenog (3). Aktivacija onkogenog mutacijom u samo jednom genu čest je slučaj kod onkogenog *ras* (3). Tri su člana porodice gena *ras*: *rasH*, *rasK* i *rasN*, onkogeni koji se najčešće susreću u ljudskim tumorima. Njih nema u normalnim stanicama, a u tumorskim nastaju iz protoonkogenog zamjenom aminokiselina na ključnim mjestima (2). Kod većine tumora aktiviraju se sva tri *ras* gena no ipak gen *rasN* prevladava u malignim oboljenjima krvotvornog sustava dok *rasK* prevladava kod karcinoma (rak razvijen iz epitelnih stanica) (5).

Tumor supresorski geni za razliku od onkogenog su recesivni geni te su potrebne dvije mutacije za nastanak tumora (5). Dok kod onkogenog pojačana aktivnost vodi ka razvoju raka, gubitkom ili inaktivacijom tumor supresorskih gena ili njihovih proteinskih produkata dolazi do nastanka raka (3). Tumor supresorski geni imaju suprotnu ulogu u regulaciji staničnog rasta. U normalnim okolnostima oni inhibiraju staničnu proliferaciju ili preživljavanje pa time i nastanak tumora. Služe kao tzv. negativna regulacijska sprega stanične proliferacije (2). Za postizanje ravnoteže, uz protein kinaze, koje aktiviraju molekule fosforilacijom, postoje i proteinske fosfataze koje vrše inaktivaciju defosforilacijom tih istih molekula.

Za otkrivanje prvog tumor supresorskog gena *Rb* zaslužna su istraživanja retinoblastoma, dječjeg tumora oka. Mehanizam djelovanja u normalnim stanicama kreće fosforilacijom proizvoda *Rb* gena protein kinazama što dovodi do inaktivacije *Rb* proteina. Faktor rasta tada se slobodno veže na DNA i time započinje dioba stanica. Po završetku diobe fosforilaze defosforiliraju *Rb* protein te se on ponovno veže za transkripcijski faktor i sprječava daljnju proliferaciju (6).

Iznimno je važan tumor supresorski gen *p53* čiji je proteinski produkt transkripcijski čimbenik *p53*. Dva su osnovna načina djelovanja čimbenika *p53*: aktivira popravak oštećene DNA ili potiče apoptozu. Ukoliko stanici nedostaje gen *p53* ili je inaktivan, tada će u diobu ući stanice s oštećenjem DNA što izravno povećava vjerojatnost nastanka raka. Popravak oštećene DNA homolognom rekombinacijom mehanizam je djelovanja tumor supresorskih gena *BRCA1* i *BRCA2*. Njihova mutacija povezana je s nasljednim rakom dojke i jajnika (3).

Čini se kako rak nastaje kombinacijom genetskih promjena koje podrazumijevaju prisutnost abnormalnih proizvoda onkogenog i odsutnost proteinskih proizvoda tumor supresorskih gena (6). Istraživanja aktivnih onkogenog i inaktivnih tumor supresorskih gena pokazala su da za zloćudnu preobrazbu stanice potrebne su paralelno promjene nekoliko protoonkogenog i tumor supresorskih gena. Te promjene postupno dovode do promjene fenotipskih svojstava zdravih

stanica iz kojih se razvijaju premaligne tvorbe, iz kojih naposljetku nastaju zloćudne novotvorine (7).

### 1.1.2 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ

Rak je veliki javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Poslije krvožilnih bolesti i bolesti srca, drugi je po redu najvažniji uzrok smrti (8).

Broj novodijagnosticiranih zloćudnih novotvorina u 2018. godini u Hrvatskoj bio je 25 623 i to 13 952 muškarca i 11 671 žena. Stopa incidencije iznosila je 626,8/100 000; 706,4/100 000 za muškarce i 552,4/100 000 za žene. Odnos M:Ž je 54:46. U 2018. godini od raka je umrlo 13 809 osoba, 8 049 muškaraca i 5 760 žena. Stope mortaliteta bile su 337,8/100 000; odnosno 407,5/100 000 (M) i 272,6/100 000 (Ž). Odnos M:Ž je 58:42 (9).

Ukupno 57% novih slučajeva raka u muškaraca čini ovih pet sijela: prostata (21%), traheja, bronhi i pluća (16%), kolon (9%), rektum, rektosigma i anus (6%) i mokraćni mjehur (5%). Dok su pet najčešćih sijela raka u žena bila: dojka (24%), traheja, bronh i pluća (9%), kolon (8%), tijelo maternice (7%) i štitnjača (5%), čineći 53% novih slučajeva raka u žena (9).



## 1.2 RAK DOJKE

### 1.2.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak dojke daleko je najčešći tumor u žena, a drugi je po učestalosti zloćudni tumor u čovjeka. Istraživanja pokazuju da će svaka deveta žena tijekom svog života dobiti rak dojke. Godišnje se u Hrvatskoj dijagnosticira oko 2600 novih slučajeva, a 800 žena premine zbog zloćudnih novotvorina dojke. Zapažene su razlike u stopama pobola između Azije i zapadnog svijeta gdje su stope mnogo više. Osim te zemljopisne varijacije, primijećena je različita učestalost raka dojke ovisno o stupnju ekonomskog razvoja. Incidencija razvijenih zemalja kreće se od 60 do 100/100 000 žena, a kod slabije razvijenih zemalja od 20 do 60/100 000 žena.

Glavni čimbenik rizika je duljina izloženosti estrogenu. Iz toga proizlazi da dob nastupa menarhe i menopauze, dob kod prve trudnoće te broj trudnoća su izravno povezani s vjerojatnošću nastanka raka (10). Ostali čimbenici rizika za nastanak raka dojke su: pozitivna obiteljska anamneza, indeks tjelesne mase (ITM), uzimanje oralnih kontraceptiva ili hormonske nadomjesne terapije te zračenje (11).

Rak dojke je veliki javnozdravstveni problem sa milijun i 400 tisuća novih slučajeva diljem svijeta i gotovo 460 tisuća smrtnih slučajeva. Epidemiološke studije naglašavaju važnost omogućavanja ženama diljem svijeta mogućnost pristupa zdravstvenoj zaštiti od probira do liječenja (12).

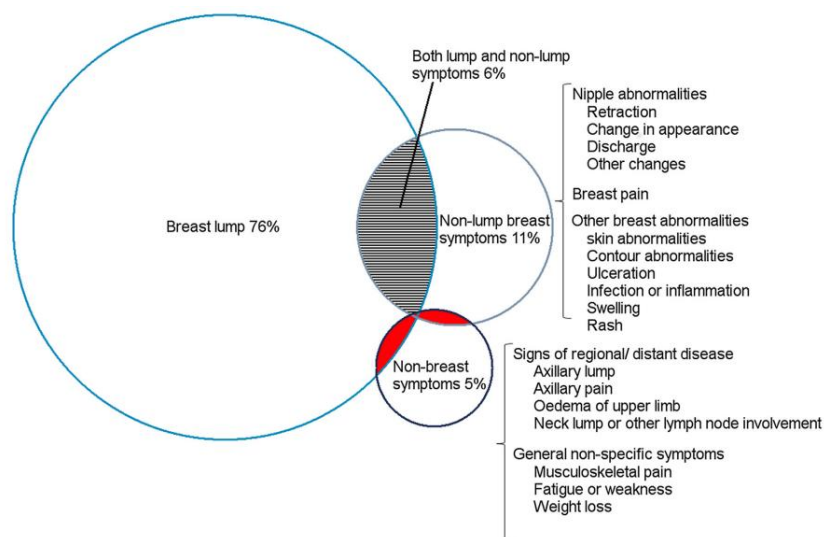
### 1.2.2 PATOHISTOLOGIJA

Rak dojke heterogena je bolest te svaku podvrstu karakteriziraju specifične histološke i biološke značajke, klinička prezentacija te reakcija na terapiju (13). Histogenetski, tumori dojke nastaju iz strome ili epitela (14). Rak dojke najčešće je podrijetlom epitelnih stanica izvodnih kanalića (duktalni rak), iz žljezdanih lobula (lobularni rak) ili iz žljezdanog parenhima dojke, a rjeđe su to tumori neepitelnog podrijetla potporne strome (10, 13). S obzirom na invazivnost, dijele se na neinvazivne karcinome dojke koji se još nazivaju i karcinomima *in situ* (ne probijaju bazalnu membranu) te na invazivne karcinome koji probijaju bazalnu membranu (10, 14). Invazivni duktalni karcinom javlja se u 70 - 80% slučajeva, a invazivni lobularni u 10 - 15% slučajeva dok su specifični podtipovi raka

zastupljeni u manjem postotku (10). Danas se na osnovu imunohistokemijskih i genetskih obilježja rak dojke dijeli na luminalne tumore tipa A, luminalne tumore tipa B, HER2 pozitivne i trostruko negativne. Tumor tip A karakterizira visoka razina progesteronskih i estrogenskih receptora, postotak Ki-67 manji od 20% i HER2 biljeg negativan. Tumor tip B ima nisku razinu progesteronskih receptora ili Ki-67 viši od 20% ili HER2 biljeg pozitivan (10). Najlošiju prognozu imaju trostruko negativni tumori (bez estrogenske, progesteronske i HER2 aktivnosti), a najbolju luminalni tumori tip A (10,14).

### 1.2.3 KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA

Tri su glavne skupine simptoma raka dojke: bezbolna kvržica na dojci, simptomi dojke izuzev kvržice i opći simptomi raka dojke. Kvržica na dojci najčešći je simptom kod žena s rakom dojke te ima visoku prediktivnu vrijednost za malignost (15). Pod drugu skupinu simptoma dojke spadaju bol u dojci, krvavo-smeđi iscjedak iz dojke, promjene oblika i uvlačenje bradavice, abnormalnosti kože dojke i upala u području raka (10, 15). Treća skupina obuhvaća ostale opće simptome kao što su gubitak tjelesne težine, umor, slabost, mišićno-koštana bol, edem ruke i otečenost regionalnih limfnih čvorova (15) (Slika 2.). Inflamacijski (upalni) rak dojke karakterizira posebna klinička slika koja obuhvaća otečenost, crveno obojenje kože, osjećaj topline u dojci, edem te koža poput kore naranče (16).



**Slika 2.** Tri skupine simptoma raka dojke

Preuzeto sa: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28549339/>

Datum pristupa: 13.9.2021.

U današnje vrijeme koristeći suvremenu dijagnostičku tehnologiju (ultrazvuk, mamografiju i MR pregled dojki), redovnu samokontrolu dojki i palpacijski pregled liječnika moguće je otkriti rak dojke u pretkliničkom stadiju.

Mamografija je radiološka pretraga u kojoj se koriste x-zrake niske energije (10). Smatra se zlatnim standardnom ranog dijagnosticiranja raka dojke (15). Smanjuje smrtnost za 30% (10). Nedostatak mamografije je taj što je 80% žena smatra nelagodnom što utječe na suradljivost. Nadalje, 1% mamografija daje lažno pozitivan rezultat što rezultira nepotrebnim strahom kod žena. Također je problem mogućnost razvoja tumora u razdobljima između dviju mamografija (17).

Najčešće primjenjivana pretraga za otkrivanje raka dojke je ultrazvučni pregled. No mana mu je manja specifičnost i osjetljivost od mamografije u postavljanju rane dijagnoze posebno kod postmenopauzalnih žena (10).

Novije metode pregleda dojke kao što su spektralna mamografija s pojačanim kontrastom, MRI i MR spektroskopije s difuzijom dodatno su poboljšale dijagnostiku raka dojke (15).

#### 1.2.4 LIJEČENJE

Cilj liječenja kod lokalnog raka dojke je sprječavanje recidiva, dok je produljenje života i ublažavanje simptoma cilj kod metastatskog raka dojke (10).

Operacija raka dojke u kombinaciji s naknadnim zračenjem, terapija je izbora kod većine pacijentica. Ovisno o podvrsti raka, anamnezi pacijentice (dob, komorbiditeti) moguće je primijeniti kemoterapiju ili hormonsko liječenje (18).

Primarno liječenje upalnog i uznapredovanog raka je uvijek sistemsko nakon čega kod upalnog raka slijedi operacija i radioterapija (18).

Pacijentice s duktalnim karcinomom *in situ* (DCIS) većinom se izliječe jednostavnom mastektomijom. Kod pacijentica s invazivnim DCIS pristup liječenja može varirati (18). Budući da se stope preživljenja ne razlikuju znakovito, može se raditi poštediti zahvat na dojci (odstranjivanje kvržice bez uklanjanja bradavice) uz naknadnu radioterapiju umjesto modificirane radikalne mastektomije (mastektomija uz odstranjenje limfnih čvorova) (10).

Pacijentice s lobularnim karcinomom *in situ* (LCIS) liječe se svakodnevnim uzimanjem tamoksifena oralno. Ako iz nekog razloga pacijentica odbija uzimati lijek, u obzir može doći obostrana mastektomija (18).

U pacijentica s invazivnim LCIS ubrzo se nakon operacije započinje s kemoterapijom ili hormonskim liječenjem koje se nastavlja mjesecima ili godinama. Cilj ovakvog liječenja je

odgoditi ili spriječiti recidiv kod gotovo svih pacijentica, a kod nekih je moguće i produljenje preživljenja (18).

Kombinacijske kemoterapije kao što su ciklofosfamid, metotreksat s 5-fluorouracilom ili doksorubicin plus ciklofosfamid učinkovitije su od pojedinačnog lijeka. Prednost imaju režimi koji traju četiri do šest mjeseci jer su jednako učinkoviti kao i režimi koji traju pola godine do dvije godine. Nuspojave koje se javljaju akutno najčešće obuhvaćaju mučninu, povraćanje, zamor, upalu sluznice, alopeciju, mijelosupresiju i trombocitopeniju (18).

Hormonska terapija obuhvaća tamoksifen i inhibitore aromataze (anastrozol, letrozol, eksemestan) (18). Mehanizam djelovanja tamoksifena je selektivno kompetitivno vezanje za estrogenske receptore (on je tzv. SERM), dok inhibitori aromataze blokiraju periferno nastajanje estrogena u postmenopauzalnih žena (10, 18). Hormonsko liječenje ostvaruje učinak samo kod tumora s estrogenskim i progesteronskim receptorima. Čak kod pacijentica s ER+ tumorima niskog rizika hormonsko liječenje može zamijeniti kemoterapiju (18).

Dokazana je veća učinkovitost inhibitora aromataze u odnosu na tamoksifen, stoga im se daje prednost kod receptor pozitivnih tumora dojki postmenopauzalnih žena (10). Adjuvantna terapija tamoksifenom tijekom pet godina smanjuje smrtnost za oko 25% u premenopauzalnih i postmenopauzalnih pacijentica bez obzira na zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova. Letrozol se koristi u postmenopauzalnih žena koje su pet godina svakodnevno uzimale tamoksifen.

Nedostatak tamoksifena je činjenica da izaziva ili pogoršava postmenopauzalne simptome te povećava rizik od razvoja raka endometrija. S druge strane on pozitivno utječe na serumske razine kolesterola smanjujući tako fatalnu kardiovaskularnu incidenciju te poboljšava gustoću kosti u postmenopauzalnih žena. No korist tamoksifena u preživljavanju žena s rakom dojke ipak nadilazi navedeni rizik za razvoj raka endometrija.

Inhibitori aromataza nemaju menopauzalne nuspojave, ali povećaju incidenciju osteoporoze (18).

Kemoterapija kod pacijentica s metastazama služi za produljenje preživljavanja i poboljšanje kvalitete života (18). Prosječno preživljavanje pacijentice s metastatskim rakom nešto je duže kod HER2 pozitivnih tumora (pet godina), srednje za luminalni tip tumora (tri godine), a najkraće je za trostruko negativne tumore (godina dana) (10). Najdjelotvorniji citotoksični lijekovi za metastatski rak su doksorubicin (i njegov liposomski pripravak), gemcitabin, kapecitabin, taksani paklitaksel i dodetaksel te vinorelbin. Kombinacija lijekova pokazuje veću učinkovitost od pojedinačnih lijekova, no njome se preživljenje ne produljava, a

toksičnost se povećava. Stoga, neki onkolozi predlažu upotrebu pojedinačnih lijekova jedan za drugim.

Izbor liječenja pacijentica s metastazama ovisi o ostalim anamnestičkim podacima kao što su status hormonskih receptora, trajanje bolesti, menopauzalni status te organski sustavi zahvaćenim metastazama.

Najčešće se simptomatske metastaze liječe kemoterapijom ili hormonskom terapijom.

Zračenje je najučinkovitije za liječenje moždanih metastaza, čime se ponekad postiže dugotrajna remisija. Sistemska terapija indicirana je kod pacijentica s višestrukim metastazama izvan CNS-a. Nije dokazano da liječenje asimptomatskih metastaza značajno produljuje preživljenje, a pogoršava kvalitetu života.

U pacijentica s ER+ rakom, prednost se daje hormonskom liječenju. U menopauzalnih žena lijek prvog izbora je tamoksifen. Dok se inhibitori aromataze češće rabe kao hormonska terapija izbora u postmenopauzalnih žena (18).

Kod tumora dojke s amplifikacijom HER2/neu, trastuzumab, humanizirano monoklonsko protutijelo, učinkovito je u liječenju i nadziranju visceralnih metastaza. Rabi se samostalno ili u kombinaciji s hormonskom terapijom ili kemoterapijom (18).

## 1.3 RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

### 1.3.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak mokraćnog mjehura jedan je od najčešćih neoplazmi mokraćnog sustava (19). U Hrvatskoj se rak mokraćnog mjehura po incidenciji kod muškaraca nalazi na petom mjestu, a kod žena na devetom (20). Može se reći kako je rak mokraćnog mjehura bolest starenja jer se njegova prevalencija povećava u šestom desetljeću, a vrhunac doseže u sedmom i osmom desetljeću života (21). Prosječna dob pacijenata s rakom mokraćnog mjehura u svijetu je 73 godine (19). U prosjeku je 3,5 puta češći u muškaraca nego u žena što je djelomično povezano s učestalijim pušenjem kod muškaraca. Rak mokraćnog mjehura ima visoku prevalenciju i nizak mortalitet te je uglavnom bolest kroničnog tijeka (21). Čimbenici rizika koji dokazano uzrokuju rak mokraćnog mjehura su izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, pušenje, korištenje određenih lijekova (ciklofosfamid, fenacetin), kronična upala, postojanje kamenaca te shistosomijaza (19).

### 1.3.2 PATOHISTOLOGIJA

Točno patohistološko stupnjevanje tumora temelj je kvalitetnog odabira kemoterapije za pacijente s rakom mokraćnog mjehura. Sve je složeniji zadatak procjena raka mokraćnog mjehura zbog veće dostupnosti molekularnih podataka za njegove histološke podtipove (22). Patohistološki, rak mokraćnog mjehura se dijeli na rak prijelaznog (urotelnog) epitela (90%), rak pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) i rak malih stanica (1%).

Oko 70% tumora mokraćnog mjehura ne prodiru u mišićni sloj nego zahvaćaju površinu unutarnje stjenke mokraćnog mjehura. Karcinomi prijelaznog epitela skloni su recidiviranju pa će oko 50% pacijenata doživjeti povrat raka u mjehuru unutar pet godina (19). S druge strane, 20% tumora mokraćnog mjehura prodiru u mišićni sloj. Metastatski karcinom mokraćnog mjehura javlja se u 5% slučajeva.

Čak 90% tumora mokraćnog mjehura otpada na rak prijelaznog epitela. Drugi po učestalosti je planocelularni karcinom urotrakta. Može biti udružen sa shistosomijazom ili bez nje. Adenokarcinom je treći po učestalosti maligni tumor mokraćnog sustava. Rak malih stanica najrjeđi je tip te je izgledom sličan raku malih stanica pluća (23).

### 1.3.3 KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA

Glavni simptom raka mokraćnog mjehura, koji se javlja u 90% bolesnika, je bezbolna hematurija. Može biti mikroskopska (krv vidljiva samo pod mikroskopom) ili makroskopska (krv vidljiva u mokraći). Stupanj hematurije nema korelaciju s ozbiljnošću bolesti. Hematurija nije nužno uzrokovana rakom mokraćnog mjehura, može nastati i zbog bubrežnih kamenaca, BHP, intersticijskog cistitisa, raka prostate ili bubrega. Svaki pacijent koji ima hematuriju mora se obratiti urologu da bi se isključio rak mokraćnog mjehura.

Mogu se još pojaviti i učestalo mokrenje (zbog smanjenog kapaciteta mjehura) i simptomi urinarne infekcije (hitnost, pečenje). Hidronefroza, zadržavanje mokraće, opstipacija, limfedem te opipljiva masa u zdjelici javljaju se u fazi lokalnog širenja karcinoma. Kod metastatskog karcinoma simptomi se pojavljuju vezano uz sijela presadnica. Najčešće su to metastaze u trbušnim limfnim čvorovima, nadbubrežnoj žlijezdi, crijevima, plućima, jetri i kostima (19).

Klinička slika pacijenta pobuđuje sumnju na rak mokraćnog mjehura. Uzimanjem anamneze, fizikalnim pregledom i citologijom urina dobivaju se prvi dijagnostički podaci. Citologija urina, koja može otkriti maligne stanice, često bude negativna pa više služi kao pomoćna metoda. Stoga je zlatni standard u dijagnostici karcinoma mokraćnog mjehura intravenska urografija (IVU) i cistoskopija s biopsijom zapaženih promjena (19, 24). Cistoskopija se provodi kod svih pacijenata s makroskopskom hematurijom, kod starijih od 35 godina s mikroskopskom hematurijom te se može razmotriti kod mlađih bolesnika s mikroskopskom hematurijom. Pacijenti s hematurijom i rizičnim čimbenicima za rak mokraćnog mjehura (uporaba duhana, izlaganje kemikalijama) trebaju napraviti cistoskopiju bez obzira na dob (25). Ukoliko cistoskopija pokaže tumor dalje se radi transuretralna resekcija tumora u mjehuru (TURBT) (19).

Za stupnjevanje površinskih tumora dovoljna je cistoskopija s biopsijom. Za ostale tumore treba snimiti abdominopelvični CT i radiogram pluća da bi se utvrdila proširenost raka i eventualne metastaze (24). Ukoliko su povišene vrijednosti alkalne fosfataze ili su prisutni simptomi vezani za koštani sustav, predlaže se napraviti i scintigrafiju kostiju (19).

#### 1.3.4 LIJEČENJE

Liječenju raka mokraćnog mjehura pristupa se različito ovisno o tome radi li se o neinvazivnom (površinskom), mišićno-invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti (19). Stopa smrtnosti kod površinskog karcinoma mjehura iznimno je niska. Pacijenti s mišićno-invazivnim rakom imaju 5-godišnje preživljenje 50%. Nažalost, lošija je prognoza za progresivni i rekurentni invazivni rak (24).

Površinski rak mokraćnog mjehura primarno se liječi transuretralnom endoskopskom resekcijom (TUR). Nakon resekcije, potrebno je svaka tri mjeseca ponavljati cistoskopiju kako bi se na vrijeme otkrio povratak raka. Često se adjuvantno daje i imunoterapija ili kemoterapija. Kao imunoterapija za površinski karcinom mokraćnog mjehura primjenjuje se BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), a od citostatika se najčešće primjenjuje mitomicin C koji se aplicira unutar 24 h nakon resekcije te po potrebi ponovi aplikacija. Nakon primjene citostatika ne smije se mokriti barem jedan sat te se mora hodati da se što bolje zadrži kontakt lijeka s endotelom. Imunoterapija i kemoterapija dokazano produljuju preživljenje bez simptoma bolesti te značajno smanjuju broj recidiva (19).

Mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura (MIBC) visokog je stupnja zloćudnosti. Najčešći način liječenja invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura je radikalna cistektomija s neoadjuvantnom kemoterapijom cisplatinom. Rjeđe korištena trimodalna terapija (TMT) ima usporediv ishod uz očuvanje mokraćnog mjehura u više od 70% bolesnika. Kod trimodalne terapije radi se o maksimalnoj transuretralnoj resekciji tumora mokraćnog mjehura praćenom radioterapijom s istodobnom kemoterapijom. Kod 70-80% pacijenata postiže se potpuni odgovor s TMT-om izbjegavajući radikalnu cistektomiju. Obe metode nude dugoročnu stopu preživljavanja. Idealni kandidati za TMT su pacijenti s malim tumorima jer im se tom metodom očuva mokraćni mjehur (26).

Metastatski rak može se liječiti kemoterapijom i imunoterapijom. Citostatici koji se rabe su: cisplatin, metotreksat, vinblastin, gemcitabin, doksorubicin i paklitaksel. Prvu liniju liječenja čini kombinacija cisplatine i gemcitabina (tzv. CG protokol) (19).



## 1.4 PORODICA *BRASSICACEAE*

*Brassicaceae*, odnosno kupusnjače, porodica su cvjetnica kojima pripada 338 rodova i 3.700 vrsta. Neformalno su poznate i pod nazivom krstašice kojeg su dobile zbog krstastog rasporeda latica u cvjetovima. Porodica obuhvaća mnoge biljke od ekonomskog značaja osobito one iz roda *Brassica* i *Raphanus* koji uključuju rotkvicu, kupus, brokulu, prokulicu, hren, kelj, korabu, kinesko zelje, bijeli senf, repu i hibridnu repu.

Biljke ove porodice su zeljaste te mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili trajnice. Listovi su im većinom jednostavni i naizmjenično raspoređeni. Cvjetovi su im križasti s četiri latice i čašice. Cvjetovi su najčešće žute, bijele ili boje lavande i karakteristično ih odlikuju četiri duga i dva kratka prašnika te dvokomorni jajnik koji je smješten iznad drugih dijelova cvijeta. Sjemenke nastaju u suhim plodovima koji često imaju pregrade između polovica (27).

### 1.4.1 *RAPHANUS SATIVUS* (L.)

Rotkvica (*Raphanus sativus*) jednogodišnja ili dvogodišnja je biljka iz porodice *Brassicaceae* koja se uzgaja zbog velikog sočnog korijena. Obična rotkvica podrijetlom je iz Azije ili Mediterana no uzgaja se u cijelom svijetu (28). Sastoji se od zadebljanog, sočnog hipokotila koji na dnu sadrži pravi korijen te kratke stabljike s lišćem u obliku rozete (Slika 3) (29). Korijen rotkvice je niskokaloričan i jede se sirov dok se mlado lišće može skuhati. Mogu se jesti i mladi plodovi najčešće sirovi ili pirjani. Obično se uzgajaju kao jednogodišnje biljke i vade prije cvatnje. Bijeli ili lila žilasti cvjetovi s četiri latice pojavljuju se u prvoj sezoni. Razlikuju se po veličini od nekoliko grama kod najpopularnijih američkih i europskih sorti do jednog kilograma kod japanske rotkve daikon. Jestivom korijenu, ovisno o sorti, oblik varira od sferičnog do dugog i cilindričnog ili suženog, a vanjski dio može biti bijele, žute, ružičaste, crvene, ljubičaste ili crne boje (28).



**Slika 3.** *Raphanus sativus* (L.)

Preuzeto sa: <https://www.naturepl.com/stock-photo-illustration-of-radish-raphanus-sativus--pencil-and-watercolor-image01417403.html>

Datum pristupa: 17.9.2021.

Rotkvica je svjetski važno povrće s velikim brojem boja koje utječu na nutritivnu kvalitetu. Ukupno je detektirano 133 flavonoida, uključujući 44 flavona, 16 dihidroflavona, 14 flavonoida, 28 flavonola i 9 antocijana. Metabolički profili flavonoida razlikuju se između rotkvica različite boje. Crvene i ljubičaste rotkvice sadrže slične antocijaninske spojeve zaslužne za pigmentaciju, uključujući crveni cijanidin, pelargonin i callistefin. Ljubičasta rotkva najviše je obogaćena cijanidin-o-siringinskom kiselinom i cijaninom, dok su najviše zastupljeni spojevi u tamnocrvenoj bili callistefin i pelargonin. Crne i bijele rotkvice imaju slične antocijaninske i flavonoidne profile. Iz toga zaključujemo da na boju crnih rotkvica nije utjecao antocijanin, već neki drugi metaboliti (30).

Postoje brojne zdravstvene prednosti konzumacije vrsta *Raphanus*. Smanjuju rizik pojave raka, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih poremećaja. Biljne namirnice sadrže mnogo antioksidansa koji se suprotstavljaju štetnim učincima slobodnih radikala koji nastaju kao nusprodukti vitalnog metabolizma.

Ekstrakti pripremljeni od dijelova rotkvice davno su pronašli svoje mjesto u narodnoj medicini za liječenje želučanih tegoba, upale jetre, urinarnih infekcija, konstipacije, srčanih poremećaja i čireva. Farmaceutski potencijal rotkvice pripisuje se njenim sekundarnim metabolitima: glukozinolatima, polifenolima i izotiocijanatima. Najvažnije patološke komplikacije kod kojih se primjenjuju ekstrakti rotkvice su rak, dijabetes, upala jetre i oksidativni stres.

Sekundarni metaboliti se za razliku od primarnih javljaju u manjoj količini i distribuciji te se nakupljaju u specijaliziranim stanicama i organelima. Oni u većini slučajeva djeluju kao antimikrobni agensi i antioksidansi, a sudjeluju i u obrani biljaka. Hepatoprotektivni učinci ekstrakta rotkvice opaženi su kod bioaktivnog spojeva indol-3-karbinol, 3- [etoksi-(metiltio) metil] -2-pirolidinetion i 3- (E)-(metiltio) -metilen-2-pirolidinetion, prisutnog u korijenu i klicama rotkvice.

Ekstrakt crne rotkvice ublažava ozljede izazvane ugljikovim tetrakloridom (CCl<sub>4</sub>) te sprječava nakupljanje lipida uzrokovano oksidativnim stresom. Dokazano je i da ekstrakt rotkvice pojačano regulira ekspresiju citokroma P450 (točnije CYP2E1) (31).

Dokazano je i da fitokemikalije crne rotkvice preveniraju nakupljanje kolesterola u žučnim kamencima (32).

Unos krstašica ima značajne prednosti u kemoprevenciji zbog prisutnosti glukozinolata, koji su poznati po svojim antikancerogenim svojstvima. Nekoliko je studija dokazalo antiproliferativne učinke izotiocijanata, hidroliziranih oblika glukozinolata, u različitim vrstama raka. Izotiocijanati pokazuju višestruke mehanizme djelovanja protiv raka poput regulacije enzima za detoksikaciju, aktivacije apoptoze i sprječavanja progresije staničnog ciklusa.

Ekstrakt crne rotkve značajno inhibira proliferaciju stanica HepG2 kod karcinoma jetre regulacijom sustava detoksikacije faze I i faze II citokroma P450. Antikancerogeno svojstvo ekstrakta se pripisuje glukozinolatima glukorafasatinu i 4-metiltio-3-butenil izotiocijanatu.

Nadalje, ekstrakti rotkvice pokazali su učinkovitu citotoksičnost protiv raka debelog crijeva staničnih linija HCT116. Smatra se da bioaktivne fitokemikalije sulforafan i sulforafen izazivaju apoptozu stanica raka debelog crijeva te sudjeluju u prekidu polimerizacije mikrotubula. Njihova primjena rezultirala je smrću stanica raka dok normalne stanice nisu bile zahvaćene.

Ekstrakt rotkvice aktivno inducira citotoksičnost u MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke putem puta ErbB-Akt. Taj put je povezan s receptorom epidermalnog faktora rasta (EGFR) koji je potencijalni onkogen u karcinomu dojke.

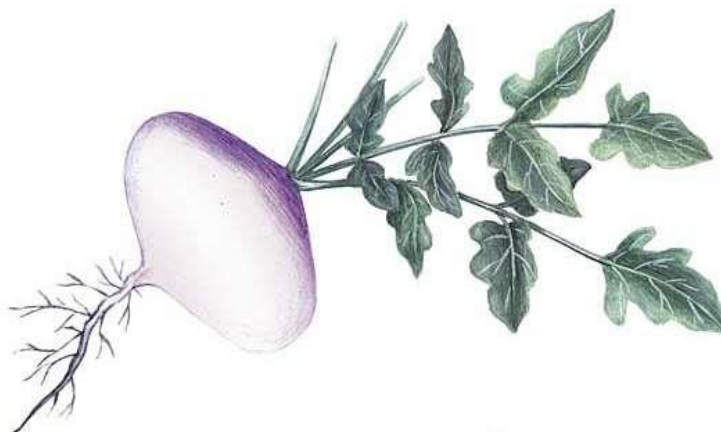
Upotreba ekstrakta rotkvice u liječenju probavnih ili želučanih tegoba od davnina je dala trag da rotkvica sadrži fitokemikalije s antidijabetičkim svojstvima. Ekstrakt topljiv u vodi pokazao je hipoglikemijska svojstva u prisutnosti inzulinu sličnih polifenola ili spojeva koji inhibiraju glukozu. Antidijabetička priroda ekstrakta rotkvice može biti posljedica mehanizama: regulacije glukoze vezane uz hormone, sprječavanje oksidativnog stresa izazvanog dijabetesom te uravnoteženje unosa i apsorpcije glukoze (31).

Tradicionalno se *Raphanus sativus* koristi još i kao protuupalno sredstvo. Točnije ulje sjemenki rotkvice ima protuupalna i antiangiogena svojstva. Stoga se može koristiti kao dodatak terapiji nesteroidnim protuupalnim lijekovima kako bi se smanjile njihove doze, a time i nuspojave (33).

#### 1.4.2 BRASSICA RAPA (L.)

Repa, (*Brassica rapa*), poznata još i kao bijela repa, dvogodišnja je biljka iz porodice krstašica (*Brassicaceae*) (Slika 4). Podrijetlom je iz srednje i istočne Azije, a danas se uzgaja u umjerenom pojasu. Ljudi je konzumiraju zbog mesnatog korijena i nježnih vrhova. Mlado korijenje repe može se jesti sirovo u salatama ili ukiseljeno, dok se mlado lišće kuha. Korijenje se također kuha no poslužuje se ili cijelo ili kao pire, a koristi se i u varivima. Korijen repe nastao je zadebljanjem primarnog korijena zajedno s bazom mlade stabljike. Tijekom prve godine stabljika ostaje kratka i nosi lišće koje na vrhu korijena čini gomilu sličnu rozeti. Listovi su travnatozeleni s grubim dlakama. U drugoj sezoni, pupoljak u središtu rozete formira uspravnu, snažnu, razgranatu stabljiku s glatkim lišćem koje ima voštanu prevlaku. Stabljika i grane na svojim završecima imaju grozdove malih križastih svijetložutih cvjetova. Sjemenke repe su glatke i izdužene te kratkih kljunova.

Repa spada u usjeve hladne sezone, ali ne traži dugu vegetacijsku sezonu. U prostorima s blagom klimom, repa se sije u rano proljeće ili kasno ljeto i izraste dovoljan usjev prije nego što nastupe ekstremi ljetnog vremena (34).



**Slika 4.** *Brassica rapa* (L.)

Preuzeto sa: <https://www.britannica.com/plant/turnip>

Datum pristupa: 17.9.2021.

U rodu *Brassica* identificirano je oko 200 glukoziolata. Mirozinaza je endogeni enzim koji hidrolizira glukoziolate u različite bioaktivne tvari. Rezultirajući produkti, epitionitrili, nitrili, supstituirani izotiocijanati, tiocijanati i oksazolidinotoni imaju ključnu ulogu u obrani biljaka i posjeduju širok raspon biološki aktivnih učinaka koji se povezuju s ljudskim zdravljem, poput zaštitnih učinaka protiv raka dojke, debelog crijeva, rektuma, pluća, želudca, prostate i gušterače.

Studije su pokazale da fenoli biljaka u ljudskoj prehrani imaju preventivnu ulogu u nastajanju raka, kardiovaskularnih bolesti, a isto tako imaju i antiestrogensko, antioksidativno i antimikrobno djelovanje. Određeni karotenoidi, skupina sekundarnih metabolita, koji su prirodno prisutni žuti, narančasti i crvenih pigmenti nakupljeni u biljnim plastidima kod ljudi su esencijalni budući da ih organizam ne može sintetizirati iz endogenih prekursora. Oni doprinose prevenciji raka, imunoloških poremećaja, degenerativnih bolesti i bolesti povezanih s dobi (35).

## 1.5 SEKUNDARNI METABOLITI PORODICE *BRASSICACEAE*

### 1.5.1 GLUKOZINOLATI

Glukozinolati (GLS) su glavna skupina biljnih metabolita koji se isključivo mogu naći u porodici krstašica (36). Kemijska konformacija GSL sadrži ostatak  $\beta$ -D-tioglukozida vezan na (Z) -N-hidroksiminosulfatni ester. Oni se mogu podijeliti u tri klase: alifatski, aromatski i indolični glukozinolati izvedeni iz aminokiselina metionina, fenilalanina i triptofana (37). Kada dođe do staničnog oštećenja, glukozinolati se hidroliziraju djelovanjem enzima mirozinaze na bioaktivne produkte: izotiocijanate, nitrile, epitionitrile, oksazolidine i tiocijanate. Ta indukcija traje neko vrijeme, pa za razliku od antioksidansa koji imaju kratko djelovanje, zaštitni učinak izotiocijanata znatno je duži (36). Nedavno su GLS-ovi stekli ogroman interes u farmaceutskoj industriji, posebno u području razvoja antikancerogenih i protuupalnih lijekova (37).

### 1.5.2 IZOTIOCIJANATI

Izotiocijanati (ITC) su bioaktivni produkti nastali enzimatskom hidrolizom glukozinolata (GLS) enzimom mirozinaza. Najzastupljeniji su sekundarni metaboliti u botaničkom redu krstašica. U zdravoj biljci mirozinaza stoji odvojena od GLS-a. Ukoliko dođe do oštećenja biljnog tkiva mirozinaza dolazi u kontakt s glukozinolatima, hidrolizira ih što rezultira nastajanjem ITC-a. Opća kemijska formula ITC-a je  $R-N=C=S$ . Oni su spojevi jakog okusa i arome, hlapljivi su i nastaju pri neutralnom pH (38).

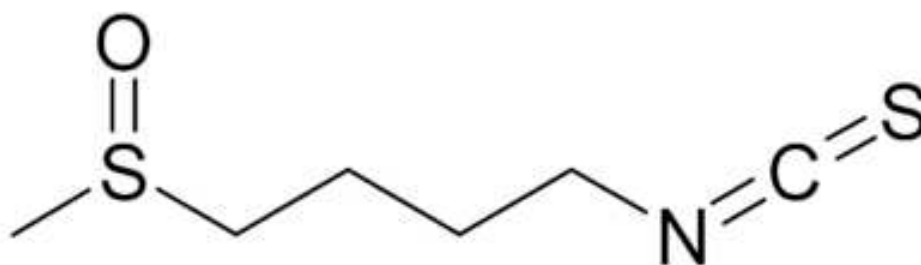
Pokazali su preventivnu aktivnost protiv brojnih kroničnih bolesti, kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, dijabetes i neurodegenerativne bolesti. Kronična upala igra ključnu ulogu u mnogim bolestima, a ITC usporavaju aktivnost nekih upalnih mehanizama, ograničavajući ciklooksigenazu 2 (COX2) i trajno deaktivirajući makrofag-inhibicijski faktor migracije (37).

### 1.5.3 SULFORAFAN

SFN (Slika 5) je važan i dobro proučen ITC nastao iz porodice biljka krstašica. SFN ima antioksidativna, antiproliferativna i antikancerogena svojstva. Epidemiološka istraživanja u Europi, SAD-u, Kini i Singapuru ukazuju na povezanost između konzumacije krstašica i opadajućeg rizika za nastanak raka. Brojne eksperimentalne studije također potvrđuju preventivni učinak SFN u kemijski induciranom raku plućima, dojke, bubrega, prostate i karcinomu debelog crijeva.

SFN je siguran i netoksičan spoj koji ispoljava aktivnost protiv raka kroz višestruke mehanizme kao što su regulacija faze I faze II citokroma P450, protuupalno djelovanje, zaustavljanje staničnog ciklusa i indukcija apoptoze, posebno putem regulacije signalnih puteva Nrf2-Keap1 i NF-κB.

Pronađeni su dokazi koji mogu poslužiti kao osnova za kliničku uporabu SFN-a u kemoprevenciji raka. Na temelju spoznaja o SFN moguće je u budućnosti razviti preventivne strategije za liječenje raka, smanjiti razvoj i ponavljanje raka te u konačnici poboljšati preživljavanje pacijenata (39).



**Slika 5.** Sulforafan

Preuzeto sa: <https://www.worldofmolecules.com/anti-aging-and-senolytics/sulforaphane-molecule.html>

Datum pristupa: 18.9.2021.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**



Cilj ovog istraživanja je utvrditi potencijalno citotoksično djelovanje uzoraka iz vrsta *Raphanus sativus* (L.) i *Brassica rapa* (L.) dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom na linije humanog karcinoma dojke MDA-MB-231 i humanog karcinoma mokraćnog mjehura T24.

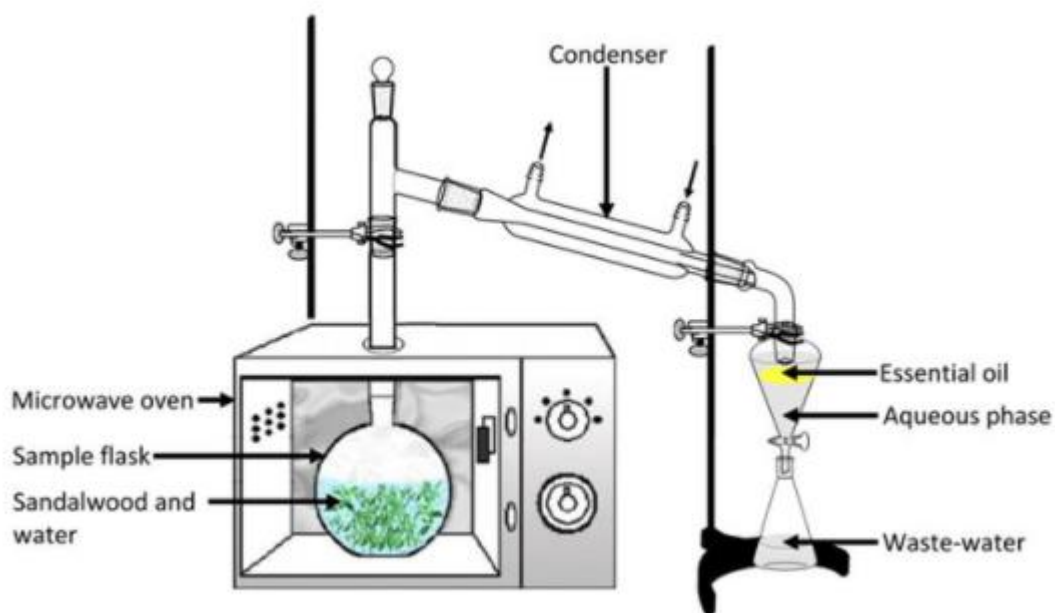
## 2.1 HIPOTEZA

Spojevi izolirani mikrovalnom ekstrakcijom iz biljki *Raphanus sativus* (L.) i *Brassica rapa* (L.) imaju citotoksično djelovanje na ispitivane stanične linije humanih karcinoma MDA-MB-231 i T24.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1 METODA IZOLACIJE

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju (Slika 6.) sačinjena je od dva dijela što omogućuje dvije vrste izolacije biljnog sadržaja. Pomoću gornjeg dijela aparature izoliraju se hlapljivi spojevi (engl. *fragrance*). Riječ je o procesu mikrovalne destilacije čiji je produkt eterično ulje. Mikrovalna destilacija ima znatno kraće vrijeme destilacije i nema upotrebe organskog otapala za razliku od hidrodestilacije.



**Slika 6.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju

Preuzeto sa: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-microwave-assisted-extraction-apparatus-used-in-this\\_fig1\\_303503961](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-microwave-assisted-extraction-apparatus-used-in-this_fig1_303503961)

Datum pristupa: 18.9.2021.

Usitnjeni biljni materijal stavi se u staklenu posudu. Zatim se poveže sustav za refluks i hladilo na posudu. Vodu napunimo u desnu vertikalnu cijev. Ona služi kao medij u kojem će se prikupiti hlapljivi spojevi koji se po završetku destilacije odvoje pomoću male količine pentana. Uvjeti destilacije su: snaga od 500W i temperatura 98 °C u vremenu od 35 minuta. Sloj pentana i hlapljivih spojeva se odvoji propipetom i prebaci u čistu čašu nakon završetka destilacije. Ostatak vode ispusti se preko pipca. Bezvodnim natrijevim sulfatom posušimo sadržaj čaše u slučaju da ima zaostale vode. Zatim se u izvaganu bočicu prebaci eterično ulje.

Dio organskog otapala, zaostalog u uzorku, uklanja se uparivačem u struji dušika. Potom uzorak ide na GC-MS analizu. Čuva se u zamrzivaču do analize.

Donji dio aparature služi za izolaciju aroma (engl. *flavour*). U čaši postavljenoj na dnu aparature se uz pomoć mikrovalova i djelovanjem gravitacijske sile sakuplja ekstrakt. Uvjeti za mikrovalnu ekstrakciju su isti kao i za mikrovalnu destilaciju (500 W, 35 minuta).

Po završetku ekstrakcije dobiva se oko 250 mL ekstrakta koji se zatim prelije u lijevak za odijeljivanje te se ekstrahira s tri puta po 10 mL diklormetana. Diklormetanski sloj se zatim odvoji, te ispusti preko pipca. Sušenje se provodi bezvodnim natrijevim sulfatom. Dobiveni ekstrakt prebaci se u prethodno izvaganu posudu, a višak organskog otapala se otkloni uparivanjem u struji dušika (kao i u slučaju mikrovalne destilacije). Dobiveni uzorci čuvaju se u frižideru i spremni su za GC-MS analizu.

### 3.2 STANIČNE LINIJE

*In vitro* ispitivanje citotoksičnog djelovanja uzoraka dobivenih iz *Raphanus sativus* (L.) i *Brassica rapa* (L.) provodilo se na humanim karcinomskim stanicama MDA-MB-231 i T24. Karakteristike ovih staničnih linija prikazane su u tablicama 1. i 2.

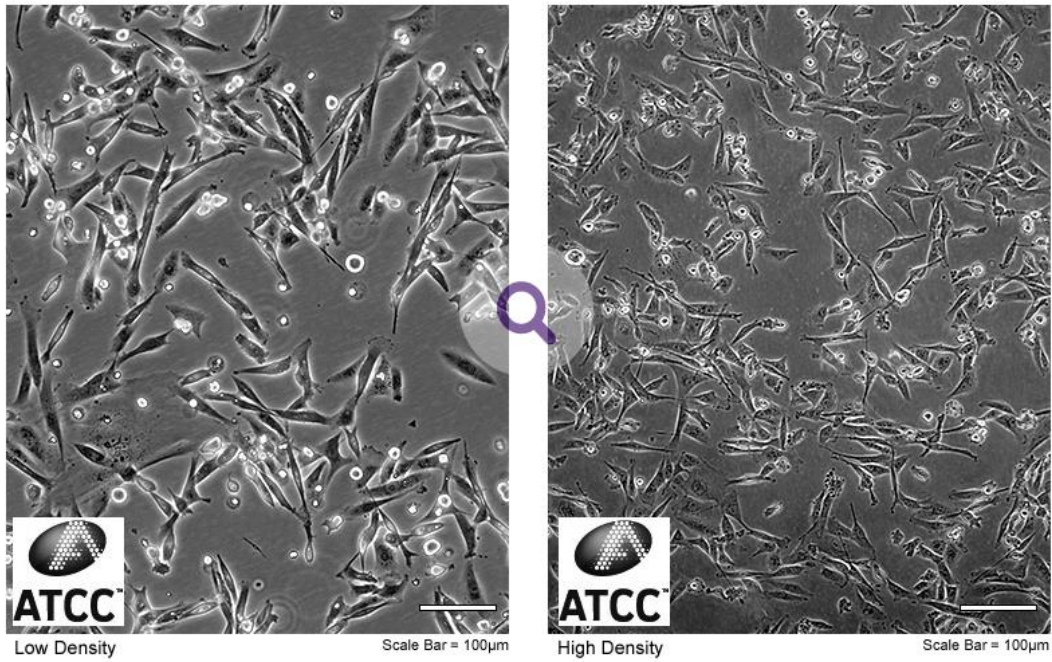
**Tablica 1.** Obilježja MDA-MB-231 stanične linije.

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

Datum pristupa: 18.9.2021.

<b>Organizam</b>	Homo sapiens, čovjek
<b>Tkivo</b>	mliječna žlijezda / dojka; izvađeno iz metastatskog mjesta: pleuralni izljev
<b>Tip stanica</b>	Epitelne
<b>Format proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Obilježja kulture</b>	Adherentna
<b>Bolest</b>	Adenokarcinom
<b>Dob</b>	51 godina
<b>Spol</b>	Žensko
<b>Etnicitet</b>	Bijela rasa
<b>Primjena</b>	Ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju.
<b>Uvjeti pohrane</b>	Parna faza tekućeg dušika

ATCC Number: **HTB-26**™  
Designation: **MDA-MB-231**



**Slika 7.** Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

Datum pristupa: 18.9.2021.

**Tablica 2.** Obilježja T24 stanične linije.

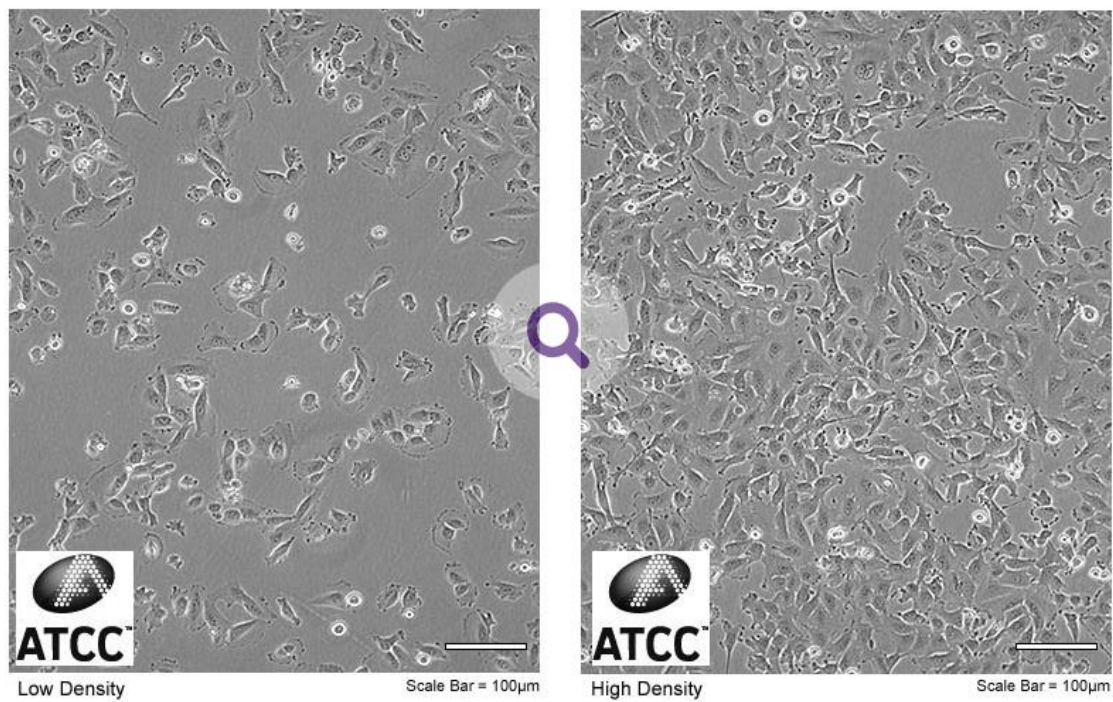
Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-4.aspx>

Datum pristupa: 18.9.2021.

<b>Organizam</b>	Homo sapiens, čovjek
<b>Tkivo</b>	Mokraćni mjehur
<b>Format proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Obilježja kulture</b>	Adherentna
<b>Bolest</b>	Karcinom prijelaznog epitela
<b>Dob</b>	81 godina
<b>Spol</b>	Žensko
<b>Etnicitet</b>	Bijela rasa
<b>Primjena</b>	Ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju.



ATCC Number: **HTB-4**™  
Designation: **T24**



**Slika 8.** Karcinomske stanice T24 stanične linije

Preuzeto sa: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-4.aspx>

Datum pristupa: 18.9.2021.

### 3.3 BILJNI MATERIJALI

#### 3.3.1 *RAPHANUS SATIVUS (L.)*

**Tablica 3.** Taksonomija biljne vrste *Raphanus sativus (L.)*

Preuzeto sa:

<https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=8427&taxon=Raphanus+sativus+L>

Datum preuzimanja: 18.9.2021.

<b>Red</b>	<i>Brassicales</i>
<b>Porodica</b>	<i>Brassicaceae</i> (krstašice)
<b>Rod</b>	<i>Raphanus</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Raphanus sativus</i>
<b>Uobičajeni naziv</b>	mjesečna rotkvica, rodakva, rotkva, zimski rotkva, sjetvena rotkva, rotkvica

#### 3.3.2 *BRASSICA RAPA (L.)*

**Tablica 4.** Taksonomija biljne vrste *Brassica rapa (L.)*

Preuzeto sa:

<https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=1838&taxon=Brassica+rapa+L>

Datum preuzimanja: 18.9.2021.

<b>Red</b>	<i>Brassicales</i>
<b>Porodica</b>	<i>Brassicaceae</i> (krstašice)
<b>Rod</b>	<i>Brassica</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Brassica rapa</i>
<b>Uobičajeni naziv</b>	vrzina, rjepa, repa repica, repa, bijela repa, ripa, poljska vrzina, bijeli kupus

## 3.4 POSTUPAK

### 3.4.1 STANIČNA KULTURA

Uzgoj stanica provodili smo u laboratoriju koji ima kabinete za sterilan rad uz laminarni protok zraka kako bi se rizik kontaminacije staničnih kultura sveo na minimum. Reagensi, pribor i posuđe koje smo koristili također moraju biti sterilni.

Stanične linije su nakon odmrzavanja uzgojene u DMEM mediju (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) u inkubatoru na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub> i visoku vlažnost zraka (Slika 9.).

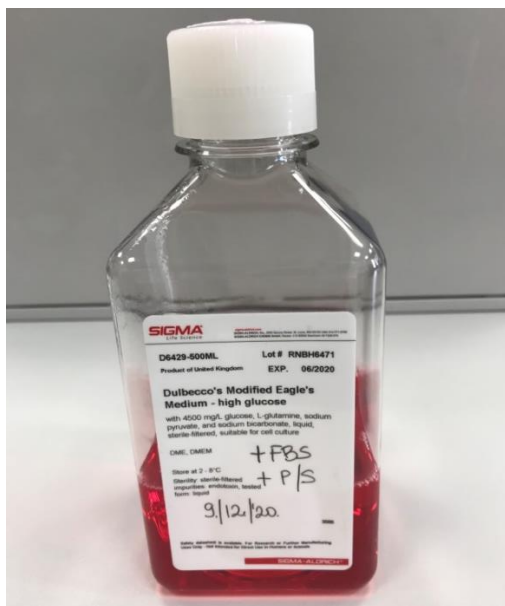


**Slika 9.** Vlažni inkubator za uzgoj stanica

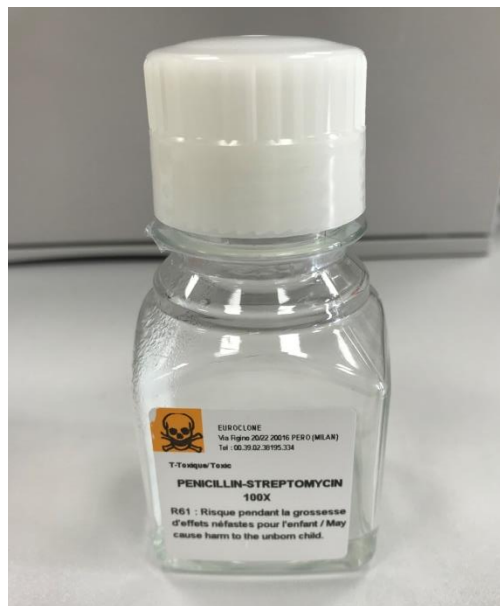
Preuzeto sa: <https://nuve.com.tr/Products/Incubation/ec-160-co2>

Datum preuzimanja: 19.9.2021.

Za uzgoj staničnih linija MDA-MB-231 i T24 koristili smo DMEM medij uz dodatak FBS-a (*Fetal bovine serum*) te penicilina/streptomocina kao antibiotika (Slika 10. i 11.). DMEM medij sadrži sve potrebne nutrijente za stanice, kao što su ugljikohidrati, aminokiseline, minerali i vitamini. Osim toga, u njemu se nalazi i *Red fenol* indikator koji promjenom boje iz crvene u žutu ukazuje da je potrebno promijeniti medij. Pločice sa stanicama zatim su ostavljene preko noći kako bi se stanice prihvatile na podlogu.



Slika 10. DMEM medij s FBS-om



Slika 11. Penicilin/Streptomycin

Adherirane stanice smo potom, nakon odsisavanja DMEM-a, isprali PBS-om (fosfatni pufer) kako bi uklonili zaostali DMEM. Zatim se stanice tretiraju tripsinom (Slika 12.), enzimom koji cijepa peptidne veze što omogućava odvajanje stanica od podloge i njihovo presađivanje. Potom smo ostavili tripsin da djeluje par minuta te ga inaktivirali dodatkom svježeg medija u kojem su se stanice resuspendirale.



Slika 12. Tripsin

### 3.4.2 ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA U KULTURI

Pomoću Bürker - Türkove komorice (Slika 13.) određujemo broj stanica. Brojanje smo obavili tako da smo 50 µl stanica pomiješali s 50 µl *Trypan Blue* boje. Žive stanice, s neoštećenom staničnom membranom, vrlo su selektivne pa ne dopuštaju prolazak boje kroz membranu u stanicu i ostaju neobojene. S druge strane, mrtve stanice imaju oštećenu membranu pa poprimaju plavo obojenje vidljivo pod mikroskopom. Mi brojimo samo žive stanice, one koje nisu obojene. Suspenziju stanica s bojom smo nanijeli na Bürker-Türkovu komoricu i pod mikroskopom brojali žive stanice unutar pet kvadratića, a ukupan broj živih stanica smo zatim odredili prema formuli:

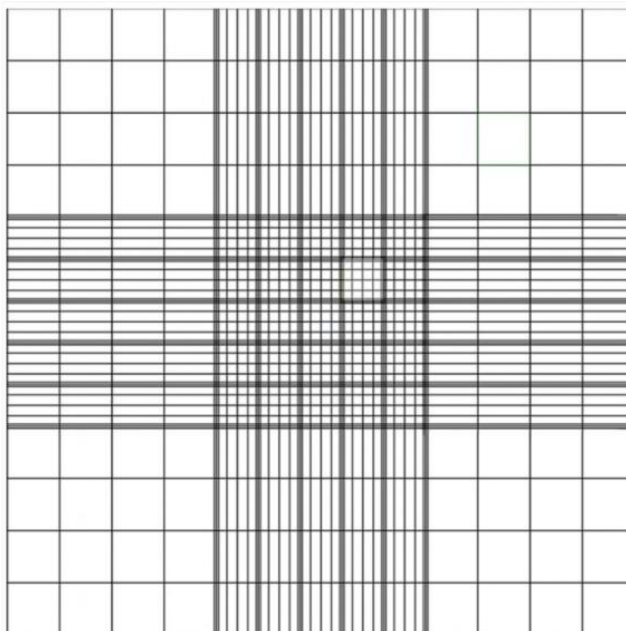
$$R = N \times 2 \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

gdje su:

R - ukupan broj živih stanica

N - broj živih stanica prebrojan u Bürker - Türkovoj komorici

2 - faktor razrjeđenja



**Slika 13.** Bürker - Türkova komorica

Preuzeto sa: <https://www.scienceabc.com/pure-sciences/what-is-a-hemocytometer-calculation-counting-how-to-use.html>

Datum preuzimanja: 19.9.2021.

### 3.4.3 TRETIRANJE STANICA KARCINOMA UZORCIMA CRVENE I CRNE ROTKVICE I BIJELE REPE

Jednak broj stanica presadili smo na četiri mikrotitarske pločice od 96 jažica te smo ostavili preko noći da se prihvate za podlogu.

U sljedećem smo koraku stanice karcinoma tretirali sa prethodno pripremljenim uzorcima različitih koncentracija crne i crvene rotkvice i bijele repe (mikrovalni ekstrakti), svaki nanesen u 3 replikata, tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. U tri prve jažice koje predstavljaju kontrolu dodali smo samo medij bez uzoraka rotkvice i repe.

### 3.5 TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Preživljenje i proliferacija stanica određuje se mjerenjem staničnog metabolizma, korištenjem MTT metode. Tetrazolin, MTT, (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) prah je žute boje kojeg da bi pripravili za upotrebu otopimo (0,02 g) u 40 mL fosfatnog pufera (PBS). Žive stanice, one koje su metabolički aktivne, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan (Slika 14). Mrtve stanice nemaju sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a.



**Slika 14.** Ljubičasto obojenje nakon dodavanja DMSO

Preuzeto sa: <http://induced.info/?s=MTT+assay++an+overview++ScienceDirect+Topics>

Datum pristupa 19.9.2021.

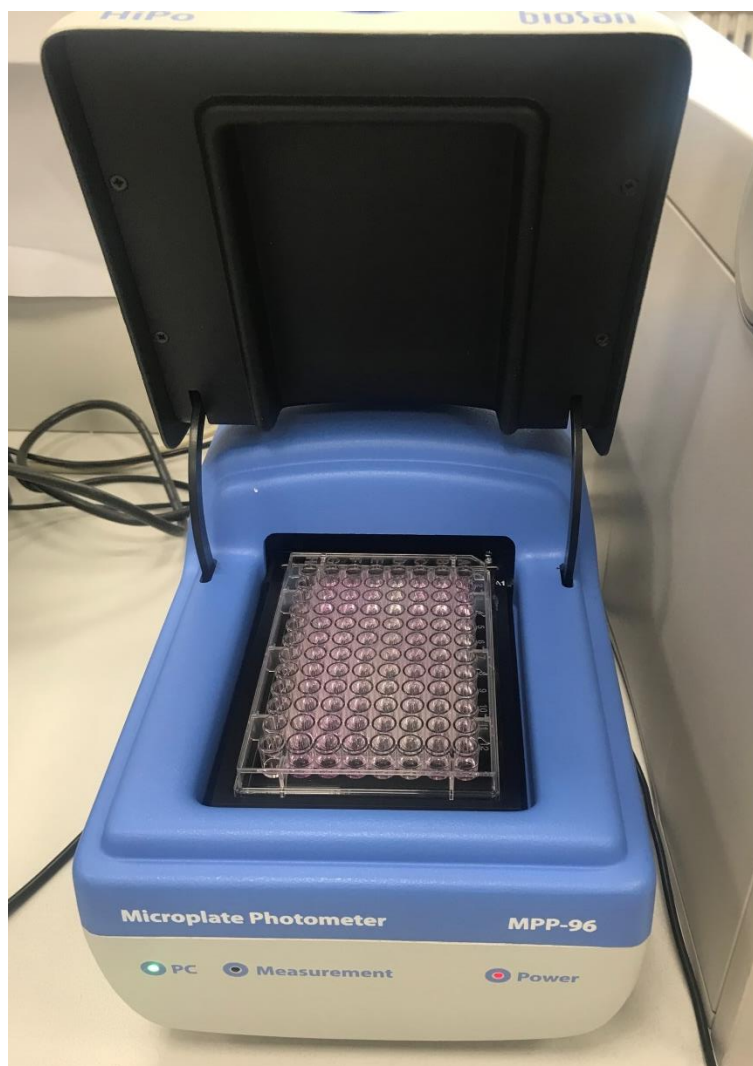
Ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski u svakoj jažici posebno, uključujući i prve tri jažice, koje su kontrolna skupina, u kojima se očekuje najviši stupanj obojenja, kao i najveća apsorbancija. Nakon što prođe sat vremena potrebno je odsisati MTT nad stanicama. Kako bi očitali apsorbanciju, nastali kristali otope se u 50  $\mu$ L DMSO (dimetil sulfoksid) te nastaje ljubičasto obojena otopina.



Pločice su inkubirane na 37°C uz treskanje tijekom 10 minuta. Apsorbancija se mjeri na 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Slika 15).

Intenzitet obojenja (tj. količina formazana) proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica u uzorku.

Omjer apsorbancije stanica tretiranih otopinama mikrovalnog ekstrakta crvene i crne rotkvice i bijele repe, te apsorbancije stanica koje nisu tretirane, pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka.



**Slika 15.** Spektrofotometar MPP-96



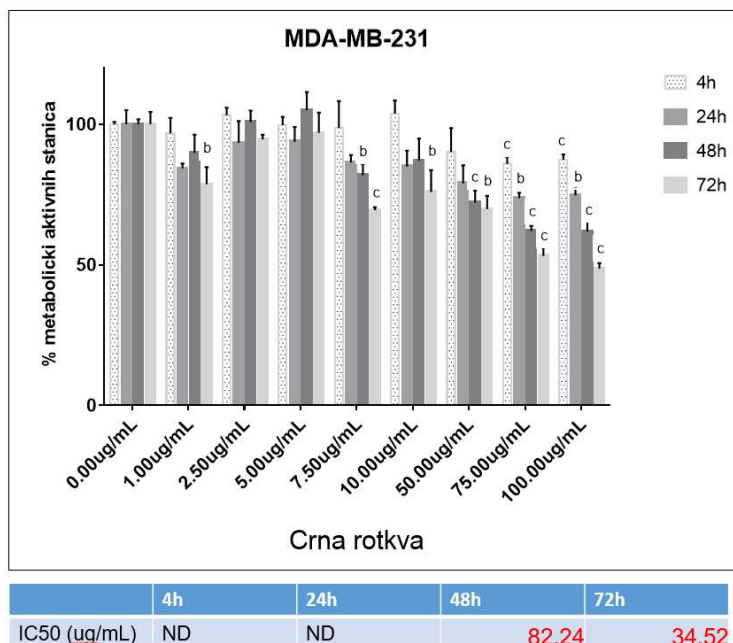
### **3.6 STATISTIČKA ANALIZA**

Za statističku analizu rezultata korišten je statistički program GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD) sa statističkom značajnošću  $P < 0.05$ . Rezultati su prikazani grafički.

## **4. REZULTATI**

## 4.1 KARCINOM DOJKE – STANIČNA LINIJA MDA-MB-231

### 4.1.1 CRNA ROTKVICA, *RAPHANUS SATIVUS*, MIKROVALNA EKSTRAKCIJA



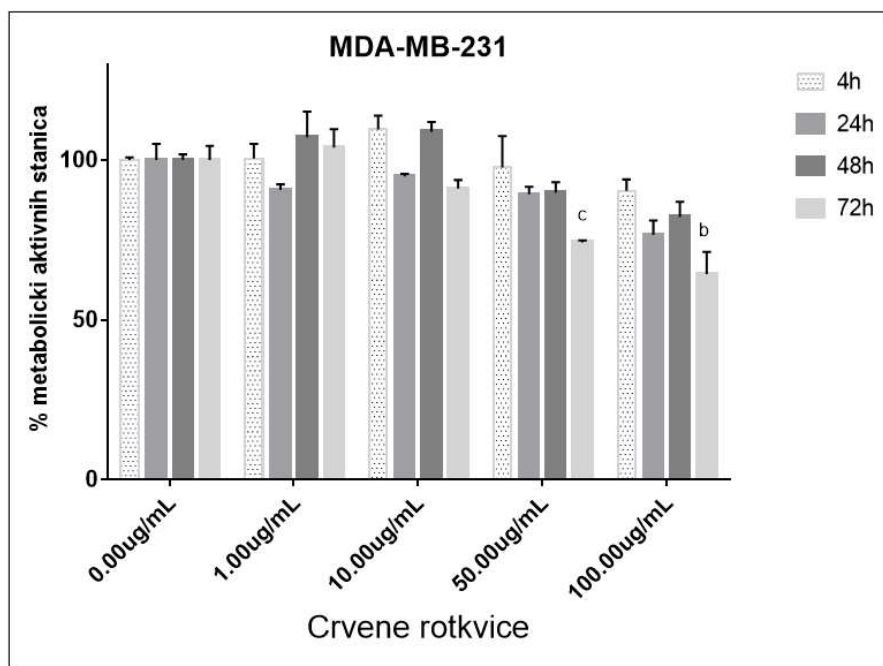
**Slika 16.** Citotoksičnost crne rotkvice, mikrovalna ekstrakcija

(IC50- koncentracija ekstrakata koja inhibira 50% metabolički aktivnih stanica; ND- ne može se odrediti; statistički značajna razlika: a-  $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

Uzorak dobiven mikrovalnom ekstrakcijom crne rotkvice pokazuje značajan citotoksični učinak nakon inkubacije od 48 i 72 h, počevši od koncentracije 1 µg/ml kod inkubacije od 72 h gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 79% ( $P < 0,01$ ), dok kod inkubacije od 48 h počinje od koncentracije 7,50 µg/ml gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 84% ( $P < 0,01$ ). Porastom koncentracije raste i citotoksični učinak, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje uz neočekivano odstupanje pri koncentracijama od 2,50 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml. Maksimalni učinak postiže se tretiranjem stanica koncentracijom od 100 µg/ml što kod inkubacije od 48 h dovodi do smanjenja metabolički aktivnih stanica na oko 62% ( $P < 0,001$ ), a kod inkubacije od 72 h na oko 48% ( $P < 0,001$ ). Pri koncentracijama 1 µg/ml, 2,50 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml vrijeme inkubacije ne prati nužno porast učinka.

Tretiranje stanica ekstraktom crne rotkvice tijekom 4 h i 24 h nije pokazalo značajan citotoksični učinak.

#### 4.1.2 CRVENA ROTKVICA, *RAPHANUS SATIVUS*, MIKROVALNA EKSTRAKCIJA



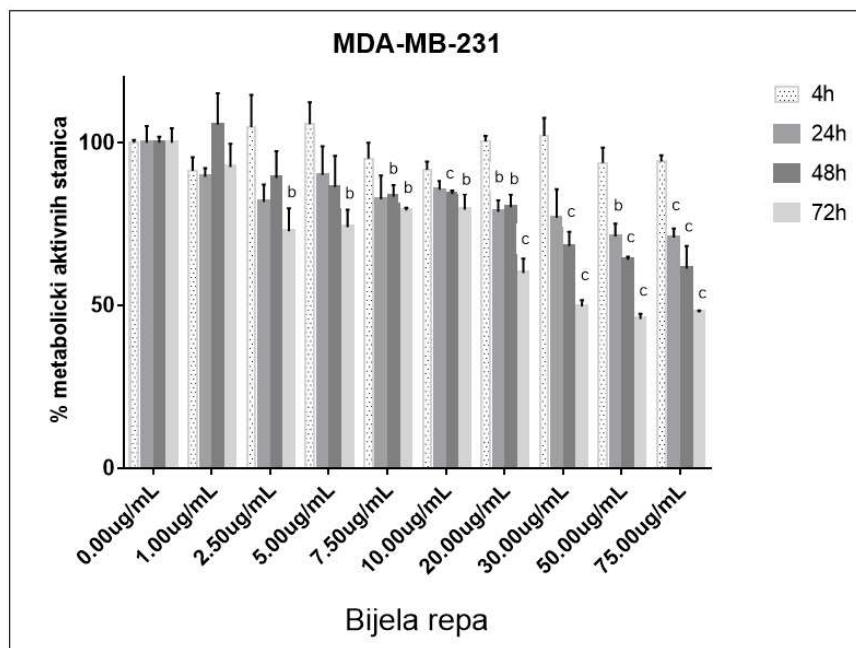
	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	ND	ND	ND	ND

**Slika 17.** Citotoksičnost crvene rotkvice, mikrovalna ekstrakcija, na staničnu liniju MDA-MB-231

(IC50- koncentracija ekstrakata koja inhibira 50% metabolički aktivnih stanica; ND- ne može se odrediti; statistički značajna razlika: a-  $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

Tretiranje stanica ekstraktom crvene rotkvice tijekom 4 h, 24 h, 48 h i 72 h nije pokazalo značajan citotoksični učinak na stanice linije MDA-MB-231.

#### 4.1.3 BIJELA REPA, *BRASSICA RAPA*, MIKROVALNA EKSTRAKCIJA



	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	ND	ND	ND	81,12

**Slika 18.** Citotoksičnost bijele repe, mikrovalna ekstrakcija, na staničnu liniju MDA-MB-231 (IC50- koncentracija ekstrakata koja inhibira 50% metabolički aktivnih stanica; ND- ne može se odrediti; statistički značajna razlika: a-  $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

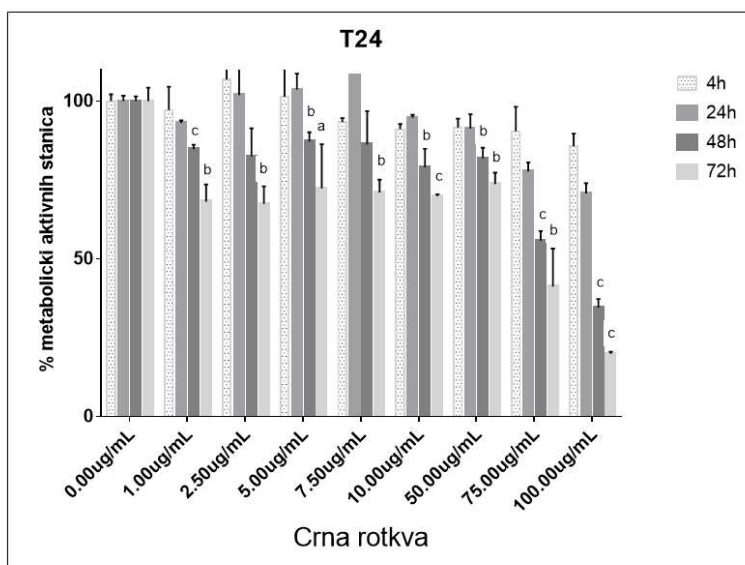
Uzorak dobiven mikrovalnom ekstrakcijom bijele repe pokazuje značajan citotoksični učinak nakon inkubacije od 72 h, počevši od koncentracije 2,50 µg/ml, gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 75% ( $P < 0,01$ ). Porastom koncentracije raste i citotoksični učinak, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje uz neočekivano odstupanje pri koncentracijama od 7,50 µg/ml, 10 µg/ml i 75 µg/ml. Maksimalni učinak vidljiv je pri koncentraciji 50 µg/ml, pri kojoj se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 49% ( $P < 0,001$ ).

Pri koncentracijama 1 µg/ml, 2,50 µg/ml, 7,50 µg/ml i 20 µg/ml vrijeme inkubacije ne prati nužno porast učinka.

Tretiranje stanica ekstraktom bijele repe tijekom 4 h, 24 h i 48 h nije pokazalo značajan citotoksični učinak.

## 4.2 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA T24

### 4.2.1 CRNA ROTKVICA, *RAPHANUS SATIVUS*, MIKROVALNA EKSTRAKCIJA



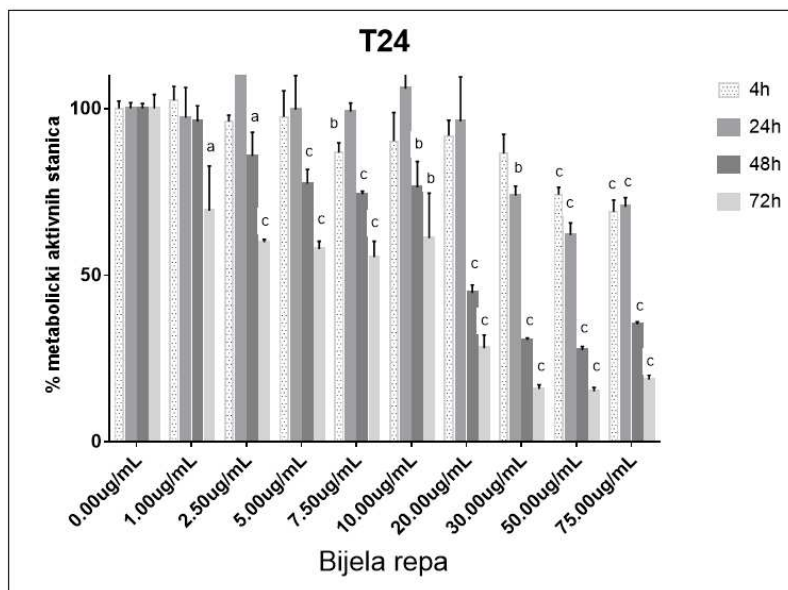
	4h	24h	48h	72h
IC50 (µg/mL)	ND	ND	ND	49,07

**Slika 19.** Citotoksičnost crne rotkvice, mikrovalna ekstrakcija, na staničnu liniju T24 (IC50- koncentracija ekstrakata koja inhibira 50% metabolički aktivnih stanica; ND- ne može se odrediti; statistički značajna razlika: a-  $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

Uzorak dobiven mikrovalnom ekstrakcijom crne rotkvice pokazuje značajan citotoksični učinak nakon inkubacije od 72 h, počevši od koncentracije 1 µg/ml, gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 70% ( $P < 0,01$ ). Porastom koncentracije raste i citotoksični učinak, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje uz neočekivano odstupanje pri koncentracijama od 5 µg/ml i 50 µg/ml. Maksimalni učinak vidljiv je pri koncentraciji 100 µg/ml, pri kojoj se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 20% ( $P < 0,001$ ).

Pri koncentracijama 5 µg/ml, 7,50 µg/ml i 10 µg/ml vrijeme inkubacije ne prati nužno porast učinka. Tretiranje stanica ekstraktom crne rotkvice tijekom 4 h, 24 h i 48 h nije pokazalo značajan citotoksični učinak.

#### 4.2.2 BIJELA REPA, *BRASSICA RAPA*, MIKROVALNA EKSTRAKCIJA



	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	ND	ND	22,58	8,038

**Slika 20.** Citotoksičnost bijele repe, mikrovalna ekstrakcija, na staničnu liniju T24 (IC50- koncentracija ekstrakata koja inhibira 50% metabolički aktivnih stanica; ND- ne može se odrediti; statistički značajna razlika: a-  $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

Uzorak dobiven mikrovalnom ekstrakcijom bijele repe pokazuje značajan citotoksični učinak nakon inkubacije od 48 i 72 h, počevši od koncentracije 1  $\mu\text{g/ml}$  kod inkubacije od 72 h gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 71% ( $P < 0,05$ ), dok kod inkubacije od 48 h počinje od koncentracije 2,50  $\mu\text{g/ml}$  gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 85% ( $P < 0,05$ ). Porastom koncentracije raste i citotoksični učinak, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje uz neočekivano odstupanje pri koncentracijama 10  $\mu\text{g/ml}$  i 75  $\mu\text{g/ml}$  kod inkubacije od 48 i 72 h. Maksimalni učinak vidljiv je pri koncentraciji 50  $\mu\text{g/ml}$ , pri kojoj se postotak metabolički aktivnih stanica smanjuje na oko 25% ( $P < 0,001$ ) kod inkubacije od 48 h, a kod inkubacije od 72 h na oko 16% ( $P < 0,001$ ). Pri koncentracijama 2,50  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 7,50  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  i 20  $\mu\text{g/ml}$  vrijeme inkubacije ne prati nužno porast učinka. Tretiranje stanica ekstraktom bijele repe tijekom 4 h i 24 h nije pokazalo značajan citotoksični učinak.

## **5. RASPRAVA**



Rak (neoplazma) predstavlja široku skupinu bolesti koje nastaju zbog poremećaja proliferacije bilo koje vrste stanica te se može pojaviti u gotovo svim organima ili tkivima u tijelu (40). Otprilike 90% slučajeva raka otpada na karcinome, zloćudne bolesti epitelnih stanica. Stanice raka nekontroliranim rastom i dijeljenjem šire se u normalna tkiva i organe pa naposljetku i po čitavom tijelu (2). Taj proces naziva se metastaziranje i glavni je uzrok smrti od raka.

Rak je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu. Kod muškaraca su najčešći rak pluća, prostate, kolorektalnog karcinoma, želuca i jetre, dok su kod žena najčešći dojke, kolorektalnog karcinoma, rak pluća, vrata maternice i štitnjače.

Veliki je javnozdravstveni problem koji vrši emocionalni, fizički i financijski pritisak na pojedince, obitelji i zdravstvene sustave. U zemljama s niskim i srednjim dohotkom veliki broj pacijenata s rakom nema pristup pravovremenoj i kvalitetnoj dijagnozi ni liječenju. U zemljama s jačim zdravstvenim sustavom stopa preživljavanja karcinoma poboljšana je zahvaljujući pristupačnom ranom otkrivanju, kvalitetnom liječenju i skrbi za preživjele.

Oko 40% smrti od raka može se spriječiti izbjegavanjem ključnih čimbenika rizika i provedbom već razvijenih strategija prevencije utemeljenih na dokazima (40).

Ispravnim životnim navikama i različitim društvenim mjerama možemo utjecati na izloženost čimbenicima i tako smanjiti rizik obolijevanja od raka. Čimbenici rizika obuhvaćaju: pušenje duhana, pasivno pušenje, konzumaciju alkohola, nezdrave prehrambene navike, prekomjerna tjelesna težina, pretjerana izloženost ultraljubičastom zračenju, profesionalna izloženost kemikalijama (azbest, etilvinil-klorid, nikal, arsen itd.), infekcije patogenima kao što su Epstein-Barr virus, virus hepatitisa B i C, *H. pylori*, HIV tipa 1, humani papiloma virus tipovi 16 i 18 (41).

Najčešći rak kod žena je rak dojke sa skoro milijun i 400 tisuća novih slučajeva širom svijeta i gotovo 460 tisuća povezanih smrtnih slučajeva (12). Analiziranjem smanjenja učestalosti i smrtnosti od raka dojke otkriveno je da je od iznimne važnosti omogućiti pacijenticama pristup probiru dojke, redovitu primjenu pomoćnih terapija i poticati izbjegavanje čimbenika rizika (42). U današnje vrijeme, razvijeni su razni pristupi liječenja raka dojke, a svima je temelj individualizacija terapije. Odabir terapije prilagođava se rezultatima dostupnih kliničkih testova, što povećava mogućnost pozitivnog odgovora na odabranu strategiju liječenja (43).

Rak mokraćnog mjehura jedan je od najčešćih neoplazmi mokraćnog sustava (19). U Hrvatskoj se rak mokraćnog mjehura po incidenciji kod muškaraca nalazi na petom mjestu, a kod žena na devetom (20). Može se reći kako je rak mokraćnog mjehura bolest starenja jer se njegova prevalencija povećava u šestom desetljeću, a vrhunac doseže u sedmom i osmom desetljeću života. U prosjeku je 3,5 puta češći u muškaraca nego u žena (21). Čimbenici rizika koji dokazano uzrokuju rak mokraćnog mjehura su izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, pušenje, korištenje određenih lijekova (ciklofosfamid, fenacetin), kronična upala, postojanje kamenaca te shistosomijaza (19). Zlatni standard u dijagnostici karcinoma mokraćnog mjehura je intravenska urografija (IVU) i cistoskopija s biopsijom zapaženih promjena dok se liječenju raka mokraćnog mjehura pristupa različito ovisno o tome radi li se o neinvazivnom (površinskom), mišićno-invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti (19, 24).

Toksičnost kemoterapije ponekad stvara značajan problem prilikom liječenja. Biljke imaju ogroman citotoksični potencijal i kao takve su spremnik prirodnih kemikalija koje mogu pružiti dodatni protektivni učinak protiv raka (44).

Pozitivni učinci porodice *Brassicaceae* na ljudsko zdravlje povezani su s fitokemikalijama. Ove biljke potiču detoksikacijske enzime, stimuliraju imunološki sustav, inhibiraju malignu transformaciju i kancerogene mutacije te sprječavaju oksidativni stres (45). Konzumacija povrća kao što su kupus, rotkvica, repa, brokula i drugo povrće iz ove porodice može pripomoći u smanjenju incidencije neoplazmi. Dokazi pokazuju da pojedinci s prehranom koja obiluje kupusnjačama, imaju niži rizik od razvoja raka (46). Kupusnjače sadrže puno metabolita koji su učinkoviti u prevenciji raka, što je već dokumentirano brojnim studijama te zbog prisutnosti polifenola i sumporno-organskih spojeva djeluju i antimutageno (45).

Rotkvica (*Raphanus sativus*) jednogodišnja ili dvogodišnja je biljka iz porodice *Brassicaceae* (28). Zdravstvene prednosti konzumacije rotkvica uključuju smanjenje rizika pojave raka, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih poremećaja. One sadrže mnogo antioksidansa koji se suprotstavljaju štetnim učincima slobodnih radikala koji nastaju kao nusprodukti vitalnog metabolizma. Ekstrakti pripremljeni od dijelova rotkvice davno su pronašli svoje mjesto u narodnoj medicini za liječenje želučanih tegoba, upale jetre, urinarnih infekcija, konstipacije, srčanih poremećaja i čireva. Farmaceutski potencijal rotkvice pripisuje se njenim sekundarnim metabolitima: glukozinolatima, polifenolima i izotiocijanatima. Najvažnije patološke komplikacije kod kojih se primjenjuju ekstrakti rotkvice su rak, dijabetes, upala jetre i oksidativni stres (31).

Bijela repa (*Brassica rapa*), dvogodišnja je biljka iz porodice krstašica (*Brassicaceae*) (34). Produkti razgradnje glukozinolata repe, epitionitri, nitrili, supstituirani izotiocijanati, tiocijanati i oksazolidinotoni imaju ključnu ulogu u obrani biljaka i posjeduju širok raspon biološki aktivnih učinaka koji se povezuju s ljudskim zdravljem, poput zaštitnih učinaka protiv raka dojke, debelog crijeva, rektuma, pluća, želudca, prostate i gušterače (35).

Glukozinolati su nestabilni spojevi koji se enzimom mirozinazom razgrađuju u biološki aktivne indole i izotiocijanate (45). Prirodni izotiocijanati (ITC) uključuju alil izotiocijanat (AITC), sulforafan (SFN) benzil izotiocijanat (BITC), erucin (ECN) i fenetil izotiocijanat (PEITC). Kemopreventivni mehanizmi izotiocijanata uključuju modulaciju upalnih proteina povezanih s rakom, zaustavljanje staničnog ciklusa, staničnu smrt, angiogenezu i metastaziranje kao i modulaciju enzima koji metaboliziraju karcinogene tvari (47). Sulforafan je važan i dobro proučen ITC koji ima antioksidativna, antiproliferativna i antikancerogena svojstva. Pronađeno je dovoljno dokaza koji mogu poslužiti kao osnova za kliničku uporabu SFN-a u kemoprevenciji raka. Na temelju spoznaja o SFN moguće je u budućnosti razviti preventivne strategije za liječenje raka, smanjiti razvoj i ponavljanje raka te u konačnici poboljšati preživljavanje pacijenata (39).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su mikrovalni ekstrakti iz biljnih vrsta *Raphanus sativus* i *Brassica rapa*, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije: MBA-MD-231 (karcinom dojke) i T24 (karcinom mokraćnog mjehura).

*In vitro* istraživanjem na stanicama karcinoma dojke (MDA-MB-231) dokazano je da uzorci crne rotkvice i bijele repe imaju određeni učinak na smanjenje broja metabolički aktivnih stanica. Najznačajniji učinak vidljiv je kod mikrovalnog ekstrakta crne rotkvice pri koncentraciji od 100 µg/mL, gdje se nakon inkubacije od 72 h broj metabolički aktivnih stanica smanjio na oko 48%.

*In vitro* istraživanje na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura (T24) pokazalo je vidljiv učinak crne rotkvice i bijele repe na smanjenje broja metabolički aktivnih stanica. Najznačajniji učinak vidljiv je kod bijele repe nakon inkubacije od 72 h pri koncentraciji 50 µg/mL pri čemu je došlo do smanjenja metabolički aktivnih stanica na oko 16%.

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da biljne vrste *Raphanus sativus* i *Brassica rapa* imaju potencijal za nadopunu liječenja različitih bolesti. Posebno je važno istaknuti njihova kemoprotektivna i antitumorska svojstva koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama dojke (MDA-MB-231) i mokraćnog mjehura (T24). Citotoksični učinak ovih biljaka ovisi o njihovoj koncentraciji i vremenu izlaganja. Stoga je glavna hipoteza potvrđena

i ostvaren je cilj istraživanja. Potrebno je provesti dodatna *in vivo* istraživanja, koja će utvrditi pozitivne učinke ovih spojeva ili lijekova temeljenih na njihovoj strukturi, te učiniti ih korak bliže uvrštavanju u terapiju različitih bolesti.

## **6. ZAKLJUČAK**

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 i karcinoma mokraćnog mjehura T24 uzorcima crne rotkvice i bijele repe, dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom, dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.
- 2) Ispitivani ekstrakti pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji.
- 3) Djelovanje ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju vremena inkubacije i koncentracije te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.
- 4) Najveći citotoksični učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 ostvario je mikrovalni ekstrakt crne rotkvice nakon 72 h inkubacije, a na staničnu liniju T24 ekstrakt bijele repe nakon 72 h inkubacije.
- 5) Ekstrakt crvene rotkvice nije pokazao značajan citotoksični učinak na staničnu liniju MDA-MB-231.
- 6) Citotoksični učinak ekstrakata *Raphanus sativus (L.)* i *Brassica rapa (L.)*, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen. Idući korak bio bi potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma dojke i mokraćnog mjehura kod životinja.

## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednici. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 149-150.
2. Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Gordan Lauc, urednici. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 725-755.
3. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 3- 10.
4. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. Zloćudna preobrazba i rast: Nestabilnost genoma i poremećaj staničnog ciklusa u karcinogenezi. U: Kovač Z, urednici. Patofiziologija. 7. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 669-672.
5. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res.* 1988;195(3):255-71.
6. Yarbrow JW. Oncogenes and cancer suppressor genes. *Semin Oncol Nurs.* 1992;8(1):30-9.
7. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur., Zloćudna preobrazba i rast: Biološka karcinogeneza. U: Gamulin S, urednici. Patofiziologija. 7. obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 681-688.
8. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Epidemiologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 20.
9. Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Lončar J, Čukelj P, Veltruski J i sur. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018., Bilten 43, Zagreb, 2020.



10. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 203-13.
11. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;151:1-32.
12. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys.* 2015 Jun;72(2):333-8.
13. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they. *Mol Oncol.* 2010 Jun;4(3):192-208.
14. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti dojke: Tumori dojke. U: Raič A, urednici. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 645-656.
15. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017 06;48:140-6.
16. Robertson FM, Bondy M, Yang W, Yamauchi H, Wiggins S, Kamrudin S et al. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(6):351–375.
17. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Prevencija i rana dijagnostika zloćudnih tumora. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 27.
18. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Rak dojke [Internet]. (citirano 13.9.2021.) Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/bolesti-dojke/rak-dojke>

19. Vrdoljak, E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Tumori mokraćnog sustava. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str.153-159.
20. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu [Internet]. (citirano 14.9.2021.) Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>
21. Malats N, Real FX. Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015 Apr;29(2):177-89, vii
22. Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol.* 2018 03;15(3):143-54.
23. Liječnički vjesnik. Pariška klasifikacija- prikaz dijagnostičkih kategorija u citologiji urina [Internet]. (citirano 14.9.2021.) Dostupno na: [https://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr/pdf/5-6-2018/01\\_ljubic.pdf](https://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr/pdf/5-6-2018/01_ljubic.pdf)
24. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Rak mokraćnog mjehura [Internet]. (citirano 14.9.2021.) Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/genitourinarne-bolesti/rak-spolnog-i-mokracnog-sustava/rak-mokracnog-mjehura>
25. DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician.* 2017 Oct 15;96(8):507-514.
26. Pham A, Ballas LK. Trimodality therapy for bladder cancer: modern management and future directions. *Curr Opin Urol.* 2019 05;29(3):210-5.
27. Britannica. Brassicaceae [Internet]. (citirano 17.9.2021.) Dostupno na: <https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae>

28. Britannica. Radish [Internet]. (citirano 17.9.2021.)  
Dostupno na: <https://www.britannica.com/plant/radish>
29. Priroda i biljke. Rotkiva [Internet]. (citirano 17.9.2021.)  
Dostupno na: <https://www.plantea.com.hr/?s=rotkiva>
30. Zhang J, Qiu X, Tan 1Q, Xiao Q, Mei S. A comparative metabolomics study of flavonoids in radish with different skin and flesh colors ( *Raphanus sativus* L .). *J Agric Food Chem*. 2020 Dec 9;68(49):14463-14470.
31. Manivannan A, Kim JH, Kim DS, Lee ES, Lee HE. Deciphering the nutraceutical potential of raphanus sativus-a comprehensive overview. *Nutrients*. 2019 Feb 14;11(2):402.
32. Castro-Torres IG, De la O-Arciniega M, Gallegos-Estudillo J, Naranjo-Rodríguez EB, Domínguez-Ortíz MA. *Raphanus sativus* L. var niger as a source of phytochemicals for the prevention of cholesterol gallstones. *Phytother Res*. 2014 Feb;28(2):167-71.
33. Asif M, Yousaf HM, Saleem M, Hussain L, Mahrukh , Al Zarzour R i sur. *Raphanus sativus* seeds oilarrested in vivo inflammation and angiogenesis through down-regulation of TNF-a. *Curr Pharm Biotechnol*. 2021 Jul 2.  
doi: 10.2174/1389201022666210702120956.
34. Britannica. Turnip [Internet]. (citirano 17.9.2021.)  
Dostupno na: <https://www.britannica.com/plant/turnip>
35. Park CH, Yeo HJ, Park SY, Kim JK, Park SU. Comparative phytochemical analyses and metabolic profiling of different phenotypes of chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Foods*. 2019 Nov 19;8(11):587.
36. Kapusta-Duch J, Kopec A, Piatkowska E, Borszak B, Leszczyńska T. The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2012;63(4):389-95.

37. Manivannan A, Kim JH, Kim DS, Lee FS, Lee HF. Deciphering the nutraceutical potential of raphanus sativus-a comprehensive overview. *Nutrients*. 2019 Feb 14;11(2):402.
38. Brzović P. Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama *Lepidium* spp. (Brassicaceae) i *Moringa oleifera* (Moringaceae): diplomski rad [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017 Datum pristupa: 18.9.2021.
39. Jiang X, Liu Y, Ma L, Ji R, Qu Y, Xin Y, Lv G. Chemopreventive activity of sulforaphane. *Drug Des Devel Ther*. 2018 Sep 11;12:2905-2913.
40. World health organization. Cancer [Internet]. (citirano 21.9.2021.)  
Dostupno na: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)
41. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Etiologija raka. U: Raič A, urednici. *Klinička onkologija*. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str.15-18.
42. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. *Radiologia*. 2017 Sep - Oct;59(5):368-79.
43. Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment-from the papyrus to individualised treatment approaches. *Ecancermedicalsecience*. 2017;11:746.
44. Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AK i sur. Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Curr Drug Metab*. 2008 Sep;9(7):581-91.
45. Kapusta-Duch J, Kopec A, Piatkowska E, Borczak B, Leszczyńska T. The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2012;63(4):389-95.
46. Royston KJ, Tollefsbol TO. The Epigenetic Impact of Cruciferous Vegetables on Cancer Prevention. *Curr Pharmacol Rep*. 2015 Feb 1;1(1):46-51.

47. Veeranki OL, Bhattacharya A, Tang L1, Marshall JR, Zhang Y. Cruciferous vegetables, isothiocyanates, and prevention of bladder cancer. *Curr Pharmacol Rep.* 2015 Aug;1(4):272-282.

## **8. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj ovog istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje ekstrakata biljnih vrsta *Raphanus sativus* (L.) i *Brassica rapa* (L.) na humane karcinomske stanice dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24. Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica nakon izlaganja ekstraktima smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Materijali i metode:**

Citotoksičnost na staničnim linijama karcinoma dojke i mokraćnog mjehura ispitivala se MTT metodom. Njome se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja s mikrovalnim ekstraktima biljnih vrsta *Raphanus sativus* (L.) i *Brassica rapa* (L.) Uzorci biljki pripremljeni su u različitim koncentracijama, a učinak se određivao nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost ekstrakata određivana je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm. Uspoređivanjem apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih uzorcima biljki i apsorbancije kod kontrole (netretiranih stanica), dobili smo postotak preživljenja karcinomskih stanica.

### **Rezultati:**

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica.

Kod stanica karcinoma dojke, većina uzoraka je najveći citotoksični učinak imala pri koncentracijama od 50 µg/mL, 75 µg/mL i 100 µg/mL nakon 72 h inkubacije. Najznačajniji učinak postignut je kod uzorka crne rotkvice, dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom, pri koncentraciji od 100 µg/mL, gdje se nakon 72 h broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 48%.

Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura, većina uzoraka je najveći citotoksični učinak imala pri višim koncentracijama nakon 48 i 72 h inkubacije.

Najznačajniji učinak postignut je kod uzorka bijele repe, dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom, pri koncentraciji od 50 µg/mL, gdje se nakon 72 h broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 16%.

### **Zaključak:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 i karcinoma mokraćnog mjehura T24 uzorcima crne rotkvice i bijele repe, dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom, dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Ispitivani ekstrakti pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju vremena inkubacije i koncentracije te u pojedinim slučajevima dolazi do

oporavka stanica. Najveći citotoksični učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 ostvario je mikrovalni ekstrakt crne rotkvice nakon 72 h inkubacije, a na staničnu liniju T24 ekstrakt bijele repe nakon 72 h inkubacije. Citotoksični učinak ekstrakata *Raphanus sativus* (L.) i *Brassica rapa* (L.), što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen. Idući korak bio bi potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma dojke i mokraćnog mjehura kod životinja.



## **9. SUMMARY**

**The aim of the research:**

The aim of this research is to examine the potential cytotoxic effects of plant species extracts of *Raphanus sativus* (L.) and *Brassica rapa* (L.) on human carcinoma cells of breast MDA-MB-231 and bladder T24. It is assumed that the number of cancer cells will decrease after exposure to the extracts in comparison to the control group.

**Materials and methods:**

The cytotoxicity on breast and bladder cancer cell lines was tested by the MTT method. It is used to determine the percentage of metabolically active cells after exposure to microwave extracts of plant species *Raphanus sativus* (L.) and *Brassica rapa* (L.). Plant samples were prepared in different concentrations and the effect is seen after 4, 24, 48 and 72 hours. The efficiency of the extracts was observed spectrophotometrically by measuring the absorbance at 570 nm. By comparing the absorbance of the formed formazan in cells treated with plant samples and the absorbance of the control (non-treated cells), we obtained the survival rate of cancer cells.

**Results:**

The results are graphically presented in relation to the incubation time and the percentage of metabolically active cells.

In breast cancer cells, most samples had the greatest cytotoxic effect at concentrations of 50 µg/mL, 75 µg/mL and 100 µg/mL after 72 h of incubation. The most significant effect was achieved with the black radish sample, obtained by microwave extraction, at a concentration of 100 µg/mL, where after 72 h the number of metabolically active cells decreased to 48%.

In bladder cancer cells, most samples had the greatest cytotoxic effect at higher concentrations after 48 and 72 h of incubation.

The most significant effect was achieved with the white turnip sample, obtained by microwave extraction, at a concentration of 50 µg/mL, where after 72 h the number of metabolically active cells decreased to 16%.

**Conclusions:**

*In vitro* exposure of breast cancer cells MDA-MB-231 and bladder cancer T24 to samples of black radish and white turnip, obtained by microwave extraction, leads to decrease in the survival of these cells. The tested extracts show a cytotoxic effect depended on the incubation time and concentration. Effect of extracts is not always proportional to the increase in incubation time and concentration and in some cases cell recovery occurs. The greatest cytotoxic effect on the MDA-MB-231 cell line was achieved by black radish microwave

extract after 72 h of incubation and on T24 cell line by white turnip extract after 72 h of incubation. The cytotoxic effect of the extracts of *Raphanus sativus* (L.) and *Brassica rapa* (L.), which was also the hypothesis of our research, was confirmed. The next step is the confirmation of these effects by *in vivo* studies on the models of animal breast and bladder cancers.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Anamarija Bilić

**Datum rođenja:** 26.7.1997.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Smiljanićeva 12, 21 000 Split, Republika Hrvatska

**e-mail:** anamarija\_bilic@hotmail.com

## **OBRAZOVANJE:**

•2012. – 2016. IV. gimnazija “Marko Marulić“, Split

•2016. - 2021. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

•Ožujak, 2021. – Rujan, 2021. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Skalice

## **NAGRADE:**

•Dobitnica Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh (2019.)

## **RADNO ISKUSTVO:**

• veljača 2014- rujan 2020. Destinacijski menadžer na platformama Airbnb i Booking

• svibanj 2019.-rujan 2020. Izrada plana i rasporeda čišćenja apartmana- LUX24, Obrt za usluge

• lipanj 2015.– rujan 2020. Prodaja turističkih aranžmana- Split Walking Tour- Blue umbrella  
Dioklecijanova 3  
21000 Split

## **AKTIVNOSTI:**

•Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA)

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Vozačka dozvola:** B kategorija

**Strani jezici:** engleski jezik, njemački jezik